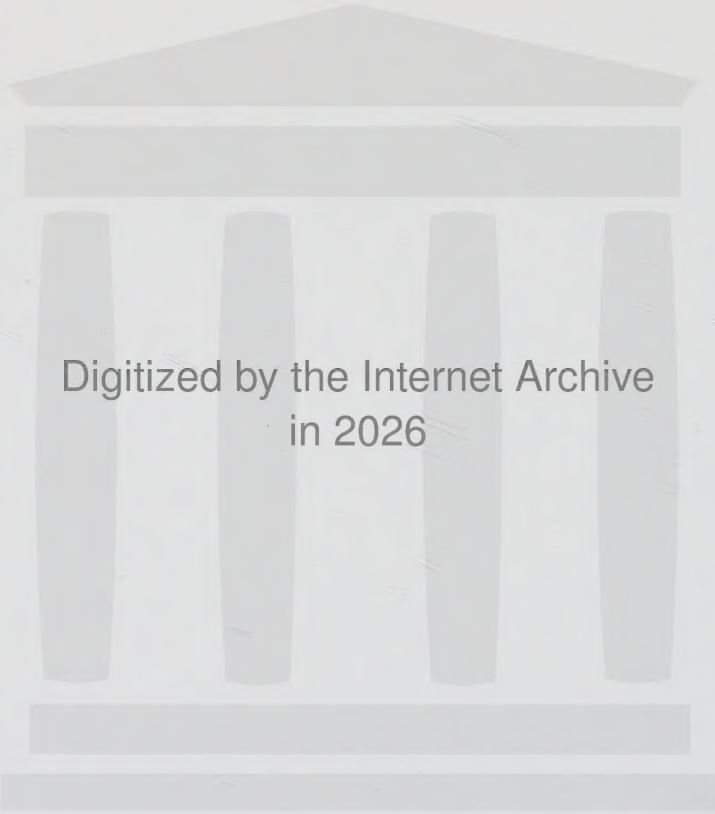


REAKTIONSVERHALTEN
VON D^U-BLUTPROBEN
MIT HERKÖMMLICHEN
ANTI-D-TESTSEREN IM VERGLEICH
MIT CHEMISCH MODIFIZIERTEN
RST-SEREN^R

Theresia Ganzenmüller



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554624_0083

Aus der III. Medizinischen Klinik der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. W. Wilmanns

Leiter des Transfusionszentrums: Prof. Dr. W. Mempel

REAKTIONSVERHALTEN VON D^U-BLUTPROBEN
MIT HERKÖMMLICHEN ANTI-D-TESTSEREN
IM VERGLEICH MIT CHEMISCH MODIFIZIER-
TEN RST-SEREN^R

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Theresia Ganzenmüller

aus

Ottobeuren

München 1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatte	Prof. Dr. W.Mempel
Mitberichterstatte	Prof. Dr. W.Wilmanns
Dekan:	Prof. Dr. W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung:	08.04.1986

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor
Dr. med. W. Mempel für die Überlassung des
Themas und die gute Zusammenarbeit mit den
Mitarbeitern des Transfusionszentrums.

Sehr herzlich danke ich Herrn Dr. med. M.
Heim, der mir jederzeit helfend zur Seite
stand.

Ebenso bedanke ich mich bei A. Schleifer und
ihrer Familie für die freundliche Einwilligung
in eine Familienuntersuchung.

A b s t r a c t

GANZENMUELLER, THERESIA:

REAKTIONSVERHALTEN VON D^U -BLUTPROBEN MIT HERKÖMMLICHEN ANTI-D-TESTSEREN IM VERGLEICH MIT CHEMISCH MODIFIZIERTEN RST-SEREN^R

Wir untersuchten insgesamt 89 D^U -Blutproben mit je drei inkompletten, "gespaltenen" RST-Seren^R und kompletten Anti-D-Seren.

Die neuen "gespaltenen" Anti-D-Seren basieren auf einer chemischen Modifikation von inkompletten Antikörpern der Klasse IgG, so daß diese wie komplette Seren reagieren. Durch Zusatz geeigneter Reagenzien werden die SH-Gruppen in der Hinge-Region und innerhalb der Fab-Fragmente gespalten. Hierdurch wird die Flexibilität der Fab-Fragmente derart erhöht, daß Rh-positive Erythrozyten bereits in einem Milieu niedriger Proteinkonzentrationen agglutiniert werden können.

Ein Vergleich des Reaktionsverhaltens dieser drei Seren zeigte, daß die gespaltenen Seren geeignet erscheinen, starke sog. "Stellungs- D^U s" zu erkennen. Eine Differenzierung zwischen Mosaik- und genetisch bedingten D^U -Formen war nicht erkennbar.

Die alleinige Verwendung gespaltenen Seren kann für die Empfänger-serologie empfohlen werden. Für die Spenderserologie sind die gespaltenen Seren wegen zu häufiger falsch-negativer Ergebnisse im Vergleich mit inkompletten Seren nur bedingt geeignet.

Die gespaltenen Seren scheinen starke "Stellungs- D^U s" erkennen zu können. Da "Stellungs- D^U s" definitionsgemäß kein Anti-D bilden können, sind wir der Ansicht, daß D^U -Empfänger, die mit allen gespaltenen Seren positiv, mit einem Teil der kompletten Seren jedoch negativ reagieren, mit Rh-positivem Blut transfundiert werden können.

1.	Einführung	1
1.1	Die Geschichte des Rh-Systems	1
1.2	Vererbungstheorien des Rh-Systems	3
1.2.1	Die Fisher - Race - Theorie	3
1.2.2	Die Wiener - Theorie	4
1.2.3	Die Rosenfield - Nomenklatur	5
1.3	Die Bestimmung des Rh-Faktors	6
1.3.1	Allgemeines zur Antigen - Antikörper- reaktion als Nachweismittel von Blut- gruppenfaktoren	6
1.3.2	Die verschiedenen Antikörpertypen	7
1.3.3	Neue "gespaltene" RST-Seren ^{RST} - Seren ^R als Alternative für komplette und in- komplette Seren	11
1.4	Die Rh-Variante D ^u	14
1.4.1	Entdeckung, ^u Benennung, Definition und Fre- quenz von D ^u	14
1.4.2	Ursachen von D ^u	17
1.5	Problemstellung	18
2.	Material und Methoden	19
2.1	Material, Einfrier- und Auftauanleitung	19
2.2	Untersuchungsmethoden	20
2.3	Testkontrollen	23
2.4	Bewertungssystem der Ergebnisse	24
3.	Ergebnisse	25
3.1	Vergleich der Reaktionsstärken von frischen und tiefgefrorenen Erythrozyten	25
3.2	Reaktionen mit D ^u -Erythrozyten mit allen Seren, nach Phänotypen untergliedert	27

3.3	Vergleich der Reaktionen der D ^U -Erythrozyten mit kompletten und gespaltenen Seren	29
3.4	Vergleich der Reaktionen der D ^U -Erythrozyten mit inkompletten und gespaltenen Seren	30
3.5	Häufigkeitsverteilung der Reaktionsstärken aller D ^U -Blutproben mit inkompletten und gespaltenen Seren	31
3.6	Familienuntersuchung und Reaktionsvergleich mit Rh-positiven Blutproben	34
3.7	Sämtliche Ergebnisse mit D ^U -Erythrozyten (n = 89) in Tabellen und Graphiken, untergliedert nach Phänotypen	37
4.	Diskussion	50
4.1	D ^U -Subklassen und ihr serologisches Verhalten mit den gespaltenen Seren	50
4.1.1	Ein D-Gen, das eine verminderte Anzahl von vollständigen D-Antigenen produziert	50
4.1.2	Suppression von D durch Geninteraktion	51
4.1.3	Fehlen eines Teils des D-Mosaiks	54
4.1.4	Die Frage der Unterscheidbarkeit der D ^U -Subklassen durch zusätzliche Verwendung von gespaltenen Seren	54
4.2	D ^U - ein Problem in der Transfusionsmedizin	58
4.2.1	Die Problematik der D ^U -Bestimmung	58
4.2.2	Die Verwendung gespaltenen Seren zur D ^U -Bestimmung	60
4.3	Die Frage der Transfusion von D-positivem Blut auf D ^U -Empfänger	62
4.3.1	Die Immunogenität von D ^U	62
4.3.2	Schlußfolgerungen aus den Reaktionen der gespaltenen Seren mit D ^U für die Transfusionspraxis	63
4.4	Familienuntersuchung	63

5.	Zusammenfassung	64
6.	Literaturverzeichnis	66
7.	Lebenslauf	71

1. Einführung

1.1 Die Geschichte des Rh-Systems

Die Entdeckung der Rh-Blutgruppen durch Landsteiner und Wiener im Jahre 1940 (18) war zweifellos das bedeutendste Ereignis auf dem Gebiet der Blutgruppenserologie seit der Entdeckung des ABO-Systems vierzig Jahre zuvor (17).

Sie hatten Kaninchen und Meerschweinchen mit Blut von Affen der Gattung *Macacus Rhesus* immunisiert und gefunden, daß die gebildeten Antikörper nicht nur die Affenerythrozyten, sondern auch die Erythrozyten von etwa 85% der weißen Bevölkerung New Yorks agglutinierten.

Zuvor war von Levine und Stetson (21) über einen hämolytischen Transfusionszwischenfall bei einer zweitgebärenden Patientin mit ABO-gleichem Blut des Ehemannes berichtet worden. Das Serum der Frau agglutinierte *in vitro* sowohl die Erythrozyten des Ehemannes als auch die von 80% der ABO-kompatiblen Probanden.

Nachdem der von Levine und Stetson beschriebene Antikörper nicht von Landsteiners und Wieners Anti-Rhesus unterscheidbar war, wurde der Name "Rh" für das Antigen und der Name "Anti-Rh" für den Antikörper festgelegt.

1941 berichteten Landsteiner und Wiener in vollem Umfang über ihre Untersuchungen(19). Sie fanden das Rh-Antigen

auf den Erythrozyten von 85% der weißen Bevölkerung
und wiesen bei 60 Familienuntersuchungen den dominanten
Charakter des Rh-Systems nach.

1.2 Vererbungstheorien des Rh - Systems

Die Ausprägung oder das Fehlen der Rh-Antigene wird ebenso wie bei den anderen Antigenen durch Gene gesteuert. Die Art und Weise dieser Steuerung ist noch nicht völlig klar.

1.2.1 Die Fisher-Race-Theorie

Nach der Fisher-Race-Vererbungstheorie (8) wird die Ausbildung von Antigenen des Rh-Systems durch drei gekoppelte Gene gesteuert, die als eine Einheit (= Genkomplex) vererbt werden.

Die Genorte werden in folgender Reihenfolge benannt: D-, C- und E-Locus. Wie die meisten Gene besitzen auch die Rh-Gene Allele, allerdings nur zwei bis drei Alternativformen für jeden Locus (z.B.: C, c und C^W oder D, (d) und D^U). Da die Chromosomen paarweise vorhanden sind, gibt es für jedes Gen zwei entsprechende Loci.

In der Fisher-Race-Nomenklatur führen das Gen und die von ihm gesteuerten Erythrozytenantigene das gleiche Symbol; der Buchstabe wird jedoch kursiv geschrieben, wenn er sich auf das Gen bezieht. Mit Ausnahme von "d" kontrolliert jedes der allelen Gene das Vorhandensein des zugehörigen Antigens auf den Erythrozyten. Das Gen "d" ist ein "stilles",

d.h. amorphes Gen, denn es wurde bisher kein d-Antigen nachgewiesen. Entgegen frühen Berichten gilt es heute als gesichert, daß kein "Anti-d" existiert (28).

1.2.2 Die Wiener-Theorie

Aufgrund der beobachteten Tatsachen kam Wiener zu einer anderen Interpretation der Vererbung im Rh-System (44). Er stellte zur Diskussion, daß ein Gen an einem Locus auf jedem Chromosom eines Chromosomenpaares alle Antigene des Rh-Systems steuert. Die zwei allelen Gene können einander gleich (homozygot) oder voneinander verschieden sein (heterozygot). Von jedem Gen existieren multiple Allele; die acht Hauptallelen werden R^0 , R^1 , R^2 , R^Z , r , r^- , r^{--} , und r^y genannt. Jedes Gen produziert auf dem Erythrozyten ein sog. AGGLUTINOGEN. Die Faktoren (= Antigene) dieses Agglutinogens können durch Reaktion mit spezifischen Antikörpern identifiziert werden (Tab.1).

Die Theorien von Fisher-Race und Wiener haben zu unterschiedlichen Nomenklaturen für das Rh-System geführt. In Tab. 1 werden die Nomenklaturen miteinander verglichen.

Es ist bis heute nicht entschieden, welche der beiden Haupttheorien über die Genetik des Rh-Systems richtig ist. In jüngster Zeit sieht man die Gene eher als Chromosomenbereiche mit vielleicht Tausenden kleiner Einheiten (Codons) an, die zusammen ein Merkmal bilden.

(Bezeichnung nach Fisher-Race)			Bezeichnung nach Wiener	
Genkomplex	Antigene	Gene	Agglutinogene	Faktoren
Dce	D,c,e	R ⁰	Rh ₀	Rh ₀ , hf, hr ^{''}
DCE	D,C,e	R ¹	Rh ₁	Rh ₀ , rh', hr ^{''}
D,c,E	D,c,E	R ²	Rh ₂	Rh ₀ , hr', rh ^{''}
DCE	D,C,E	R ²	Rh ₂	Rh ₀ , rh', rh ^{''}
dce	c,e	r	rh	hr', hr ^{''}
dCe	C,e	r'	rh'	rh', hr ^{''}
dcE	c,E	r ^{''}	rh ^{''}	hr', rh ^{''}
dCE	C,E	r'	rh _y	rh', rh ^{''}

Tab. 1: Bezeichnungen des Rh-Systems nach Fisher-Race und Wiener (23)

1.2.3 Die Rosenfield-Nomenklatur

Sowohl die Bezeichnungen von Fisher-Race als auch von Wiener beruhen auf Vererbungstheorien. Im Jahre 1962 schlugen Rosenfield et al. eine Kennzeichnung vor, bei der ohne genetische Interpretation den verschiedenen Rh-Antiseren eine willkürliche gewählte Zahl zugeordnet wird (32).

1.3 Die Bestimmung des Rh-Faktors

1.3.1 Allgemeines zur Antigen-Antikörperreaktion als Nachweismittel von Blutgruppenfaktoren

Die Blutgruppenserologie als Teil der Immunhämatologie befaßt sich mit der Erkennung von genetisch determinierten Merkmalen der korpuskulären und plasmatischen Blutbestandteile mit Hilfe immunologischer Methoden. Die Blutgruppenmerkmale (z.B. die Rh-Merkmale) wirken aufgrund ihrer biochemischen Struktur als Antigene (AG), die in einem genetisch differenten Organismus die Bildung von spezifischen Antikörpern (AK) induzieren können. Sie lassen sich mit Hilfe dieser AK definieren.

Kommt es zur immunologischen Verbindung des AG mit seinem korrespondierenden AK, so spricht man von einer Antigen-Antikörper-Reaktion (AG-AK-Reaktion).

Die am häufigsten benutzte Technik für die Bestimmung von AG und AK in der Blutserologie ist die Hämagglutination. Zu ihrer Beschreibung ist die Marrack-Heidelberg-Theorie allgemein anerkannt (12). In ihr wird postuliert, daß die agglutinierten Zellen in einem dreidimensionalen Gitter über Brücken aus bivalenten AK-Molekülen zusammengehalten werden.

1.3.2 Die verschiedenen Antikörpertypen

Blutgruppenspezifische AK gehören, wie alle anderen AK, zu den Immunglobulinen. Die Art und Weise der Reaktion der Blutgruppenantikörper ist eng verknüpft mit dem Typ von Immunglobulin, der im Serum vorliegt.

Die AK-Fraktion des Serums besteht im wesentlichen aus einer Gruppe von Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 150.000 und einer Sedimentationskonstanten 7S, deren Hauptkomponente das Immunglobulin (IgG) ist, sowie aus einer anderen Gruppe mit dem Molekulargewicht von 900.000, dem Immunglobulin M (IgM) (Abb. 1 und 2).

Die meisten der sog. "natürlichen" AK, wie Anti-A und Anti-B, gehören zur IgM-Klasse, während die immunologisch induzierten AK vorwiegend der IgG-Klasse angehören.

Mit in NaCl aufgeschwemmten Erythrozyten erzeugen die AK der IgM -Klasse eine sichtbare Hämagglutination, weil ihre Molekülgröße ausreicht, den Minimalabstand zwischen den Erythrozyten zu überbrücken. Antikörper der IgG-Klasse mit einer geringeren Molekülgröße vermögen die Zellen in physiologischer NaCl-Lösung im allgemeinen nicht zu vernetzen.

In Bezug auf die Nachweismethode der Hämagglutination werden IgM-AK als "komplette" AK und IgG-AK als "inkomplette" AK bezeichnet. Über das Verhalten in vivo wird dabei nichts ausgesagt.

Bei Vorliegen von inkompletten AK muß die Hämagglutination mit Hilfsmitteln herbeigeführt werden, z.B. durch geeignete Supplemente, die eine Milieuveränderung bewirken, oder durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Enzymen (Papain, Bromelin, Trypsin, Ficin usw.), die durch Andauung der höckerigen Erythrozytenoberfläche die Reaktionsfähigkeit fördern.

Das Supplement bewirkt durch eine "Milieuveränderung" im Serum eine Annäherung der Erythrozyten, so daß auch die kleinen IgG-Moleküle den Abstand zwischen den Erythrozyten überbrücken können. Als Supplemente können eiweißhaltige Lösungen, wie z.B. Rinderalbumin und markomolekulare Lösungen wie Dextran, Gelatine u.a. wirken.

Falls auch das Supplement die abgelaufene AG - AK - Reaktion nicht sichtbar machen kann, so ist dies meist durch Antikörper des Anti-Humanglobulin-Serums (Coombs-Serum) möglich.

Der sog. Coombs-Test oder AHG-Test (Antihumanglobulin-Test) ist die wichtigste Routinemethode zur Sichtbarmachung erythrozytengebundener IgG-AK (7).

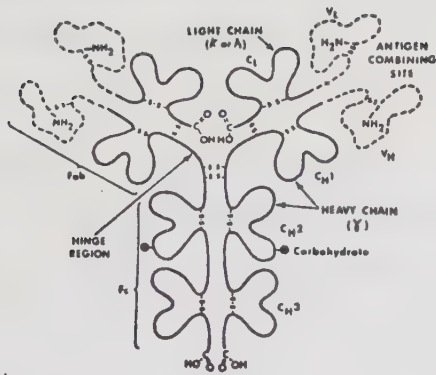


Abb. 1: Struktur eines IgG-Moleküls (2)

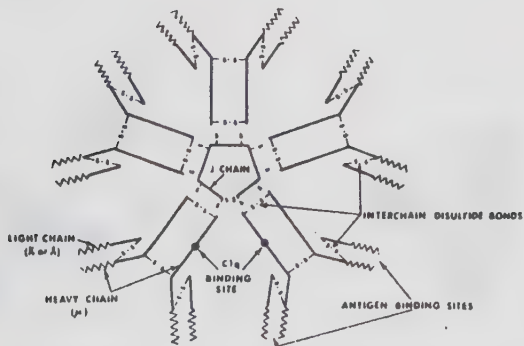


Abb. 2: Struktur eines IgM-Moleküls (2)

Das Coombs-Serum besteht gewöhnlich aus einer Mischung von Kaninchen-AK gegen menschliches IgG und gegen bestimmte Komplement - Komponenten menschlichen Ursprungs.

Die Wirkung eines Kaninchen - Anti- Humanserums wird schematisch gezeigt in Abb. 3 (23).

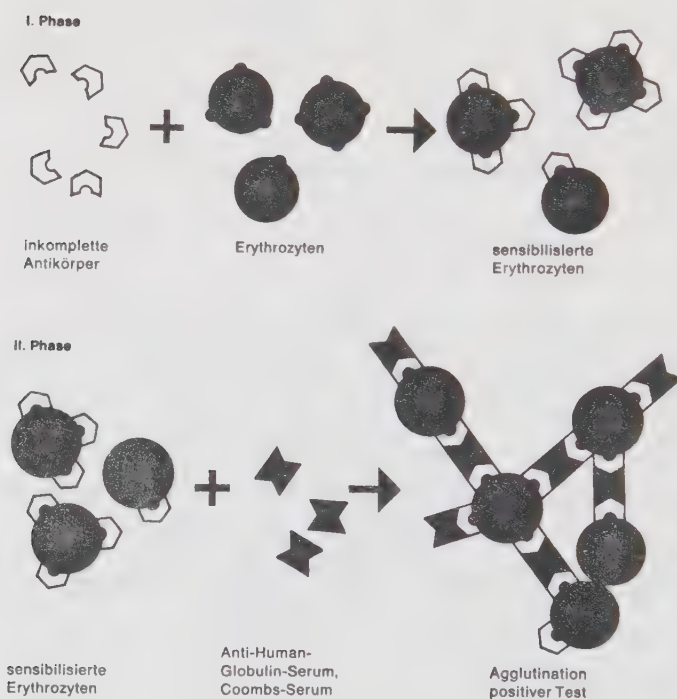


Abb. 3: Schematische Darstellung: indirekter Coombs-Test (23)

1.3.3 Neue "gespaltene" RST - Seren^R als Alternative für komplette und inkomplette Seren

Wie bereits erwähnt, sind Reaktionsverstärker notwendig, um durch Reduktion des Zetapotentials die Reaktivität der konventionellen inkompletten (IgG-) Rh-Testseren zu erhöhen. Diese Verstärker sind häufig Ursache falsch - positiver Rh-Bestimmungen.

Die kompletten (IgM)-Rh-Testseren, die diese oftmals störenden Zusätze nicht benötigen, sind meist weder in ausreichender Qualität noch Quantität verfügbar und deshalb sehr teuer.

Als Alternative für komplette und inkomplette Seren mit den genannten Nachteilen wurden von einigen Firmen neue "gespaltene" Rh-Testseren für den Kochsalzröhrchen-Schnelltest und den Objektträgertest entwickelt. Diese neuen Seren basieren auf einer chemischen Modifikation von inkomplett reagierenden Antikörpern der Klasse IgG mit Rh-Spezifität (Abb. 4 (34)). Die IgG-Antikörper, mit zwei bis elf Disulfidbrücken (je nach IgG-Subklasse) in der Gelenkregion ("Hinge-Region") zum Zusammenhalt der beiden schweren Ketten (H = heavy chain) des Moleküls sowie einer Disulfidbrücke zwischen je einer schweren (H-) und einer leichten (L = light chain) Kette werden zunächst mit Cleland's Reagenz (Dithiotreitol) behandelt.

Unter optimalen Bedingungen werden dadurch die Disulfidbrücken zwischen den Polypeptidketten des Antikörpermoleküls reduziert, d.h. gespalten, es bilden sich SH-Gruppen. Eine anschließende S-Alkylierung mit Jodacetamid verhindert die Reoxydation des Moleküls und sichert damit die neu erworbene Flexibilität der beiden Fab-Fragmente. Diese Flexibilität der modifizierten, "gespaltenen" Antikörper erhöht deren Reaktivität ausreichend, um Rh-positive Erythrozyten schon in einem Milieu niedriger Proteinkonzentrationen zu agglutinieren und falsch-positive Rh-Bestimmungen zu vermeiden (34).

Das Endprodukt enthält Rinderalbumin in einer Endkonzentration von $8 \pm 0,5\%$, Natriumchlorid und Tris (Hydroxymethyl)-aminomethanpuffer. IgM-Antikörper, durch Präzipitation aus dem Ursprungsmaterial gewonnen, können vor der letzten Verdünnungsstufe zugesetzt werden. Zur Haltbarmachung ist Natriumazid zugefügt (0,1%). Weitere Zusätze werden nicht verwendet.

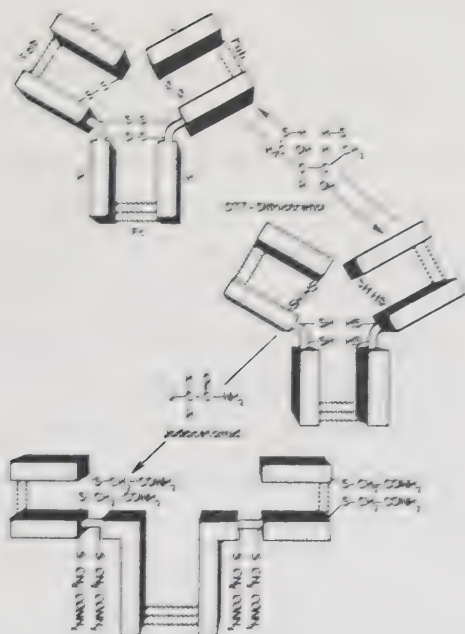


Abb. 4: Chemische Modifikation von IgG-Antikörpern - schematische Darstellung (34)

1.4 Die Rh-Variante D^U

Varianten sind Merkmale des Rh-Systems, die den gewöhnlichen Antigenen des Rh-Systems (C, c, D, d, E, u.e.) eng verwandt sind, auch an den entsprechenden Genorten vorkommen und sich kombinant nach den Mendelschen Regeln vererben. Wahrscheinlich sind sie Ausdruck echter alleler Gene. Sie lassen sich durch entsprechende spezifische Testseren (z.B. Anti-C^W) oder, wie im Fall von D^U, indirekt durch einen Dosiseffekt erkennen.

Die folgende Arbeit beschränkt sich auf die Rh-Variante D^U.

1.4.1 Entdeckung, Benennung, Definition und Frequenz von D^U

Gelegentlich findet man Blut, das im Test mit verschiedenen Anti-D-Seren einige, aber nicht alle ("some, but not all") serologischen Reaktionen zeigt, die man von einem D-Antigen erwarten würde (5).

Während Wiener (45) von sog. "intermediate variants" am D-Locus sprach, beschrieb Stratton (35) dieses neue Rh-Antigen als neues Allel "D^U" am D-d-Locus.

Vor der Entwicklung des Antihumanglobulin-Tests (Coombs-Test) konnten nur die Erythrozyten als D^U -Zellen klassifiziert werden, die im Ansatz mit der überwiegenden Anzahl agglutinierender (kompletter) Anti-D-Seren schwache bis negative Reaktionen zeigten. Nach der Einführung des Coombs-Tests wurden D^U -Arten entdeckt, die nur eine sichtbare Agglutination ergaben, wenn sie nach Inkubation mit einem inkompletten Serum dem Coombs-Test unterzogen wurden. Letztere wurden "low-grade D^U " genannt im Gegensatz zu den erstgenannten "high-grade"-Formen. Aufgrund ausgiebiger Untersuchungen weiß man heute, daß es bezüglich der Agglutinationsstärken eine breite Skala aller möglichen D^U -Spielarten gibt; fast nie reagieren zwei D^U -Formen gleich (6).

Die Definition für D^U ist nicht einheitlich. Ursprünglich bezeichnete man diejenigen Erythrozyten als D^U -Zellen, die beim Test mit vielen kompletten und inkompletten Anti-D-Seren einige, aber nicht alle Reaktionen zeigten, die man von D-positiven Zellen erwartet hätte (27).

Die meisten Untersucher akzeptieren folgende Definition: D^U -Zellen ergeben keine Reaktion mit komplettem Anti-D, agglutinieren jedoch mit inkompletten (Albumin- oder Coombs-) Antikörpern nach AHG-Zugabe.

Die traditionelle Definition erfaßt starke (high-grade) D^U -Formen nicht mehr. Überdies sind heute verwendete

"gepoolte" Seren von mehrfach immunisierten freiwilligen Probanden so stark, daß sie starke D^U -Zellen nicht mehr als solche erkennen, sondern als Rh-positiv klassifizieren (13).

Die Häufigkeit von D^U in Europa und eine Übersicht der D^U -Frequenz in verschiedenen Rhesusformeln finden sich in folgenden Tabellen (Tab. 2 + 3).

Tab. 2: D^U -Häufigkeit (%) in Europa (22)

	n	%
Italien (Mailand)	169	4,15
Spanien (Galicia)	97	1,03
Polen	182	0,55
Basken	181	0,55
Irland	204	0,49
Norwegen (Süd)	1.502	0,47
England	7.852	0,39
Norwegen (Zentral)	679	0,30
Norwegen (Ost)	5.193	0,26
Norwegen (Nord)	947	0,22
Wien	111.226	0,19
Norwegen (West)	2.868	0,10

Tab. 3: Übersicht der D^U-Frequenz in verschiedenen Rhesusformeln (16)

	cde D ^U			Cde D ^U			cdE D ^U			CdE D ^U	
	-- n	+ n	%	-- n	+ n	%	-- n	+ n	%	-- n	+ n
Renton und Mitarbeiter, England	-	-	-	23	11	32,4	41	5	10,9	-	-
Rosenfield und Mitarbeiter, New York (Weiß)	625	3	0,47	89	72	44,7	72	19	20,6	1	2
Simmons und Mitarbeiter, Australien	220	0	0	47	44	48,0	43	21	33,0	2	1
Darnborough, England	1448	1	0,069	29	19	39,6	19	10	34,5	1	1
Koller, Wien (1966 bis 1970)	17483	4	0,022	1060	136	11,4	404	64	13,5	9	4
Broman, Schweden	-	-	-	332	164	31,2	224	16	6,7	-	-

1.4.2 Ursachen von D^U

Wie schon erwähnt, versteht man unter dem D^U-Phänotyp einen D-positiven Status, bei dem das D-Antigen schwach ausgeprägt ist. Für diese schwache Reaktion sind vor allem drei verschiedene Mechanismen verantwortlich:

1. Ein D-Gen, das eine verminderte Anzahl anscheinend normaler D-Antigene produziert;

2. Eine Geninteraktion, wobei D durch ein C in Transposition in seiner quantitativen Ausprägung unterdrückt wird (sog. "Ceppellini-Effekt");
3. Ein Fehlen eines oder mehrerer Teile des normalen D- Mosaiks.

1.5 Problemstellung

Wir untersuchten in der Zeit vom 18.08.1981 bis 17.08.1982 insgesamt 89 D^U-Blutproben mit drei inkompletten, drei gespaltenen und drei kompletten Anti-D-Seren.

Die Untersuchung sollte klären:

- 1) Kann man mit der zusätzlichen Verwendung von gespaltenen Seren mit serologischen Mitteln D^U-Subklassen erkennen?
- 2) Kann allgemein die alleinige Verwendung der gespaltenen Seren bei der D^U-Bestimmung empfohlen werden?
- 3) Kann man aus dem unterschiedlichen Reaktionsverhalten der gespaltenen Seren Rückschlüsse für die Transfusion von Rh-positivem Blut auf D^U-Empfänger ziehen?

2. Material und Methoden

2.1 Material, Einfrier- und Auftauanleitung

Material:

Wir untersuchten insgesamt 89 Blutproben, welche vom BRK bzw. vom Transfusionszentrum Großhadern als D^U bestimmt worden waren, in Titerreihen.

Die Blutproben wurden mit EDTA als Antikoagulans entnommen und bis zur Untersuchung nach folgender Anleitung tiefgefroren.

Einfrieranleitung für das Erythrozytensediment:

Die Erythrozyten wurden mit einem Teil Frierlösung (Glycerin 380 g, Sorbit 29 g, NaCl 6,3 g, Aqua dest ad 1000 ml) versetzt und zehn Minuten auf dem Rüttler mit dieser Lösung vermischt. Anschließend wurden die Erythrozyten bei - 198°C in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Gasphase gelagert.

Auftauanleitung für die Erythrozyten:

1) Die Erythrozyten wurden im Wasserbad von 40°C aufgetaut und bei RCF 125g(ca. 1000U/Min.) zehn Minuten lang zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen.

2) Anschließend wurde den Erythrozyten tropfenweise Waschlösung (Sorbit 175 g, NaCl 8 g, Aqua dest ad 1000 ml) beigelegt. Das Ganze wurde auf dem Rüttler zehn Minuten lang gemischt und danach mit 1000 U/Min. zehn Minuten lang zentrifugiert.

Das Verfahren (1 und 2) wurde dann noch zweimal wiederholt.

2.2 Untersuchungsmethoden

Folgende Untersuchungen wurden von uns durchgeführt:

- Hämagglutinationstests mit 3 kompletten Seren
- Titerreihen mit je 3 inkompletten und gespaltenen Seren und Ansatz im Antihumanglobulin-Test (Coombs-Test)
- direkter Coombstest (d.C.)

Pro Versuchstag konnten maximal 5 verschiedene Blutproben untersucht werden.

Nach dem Auftauen der Erythrozyten wurde eine 5%ige Erythrozytensuspension in 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt.

Tests mit kompletten Seren

Jede Blutprobe wurde mit den drei kompletten Seren der Firmen DiaMed, Biotest und Merz & Dade nach folgender Vorschrift angesetzt: 1 Tropfen Serum wurde mit 1 Tropfen Erythrozytensuspension vermischt, 30 Minuten lang bei 37°C im Wasserbad inkubiert, 1 Minute bei 1000 U/Min. (RCF 125 g) zentrifugiert und auf Agglutination hin abgelesen.

Titerreihen mit inkompletten Seren

Für jede Blutprobe wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit den inkompletten Seren der Firmen DiaMed, Biotest und Merz & Dade hergestellt:

Es wurden je 7 Agglutinationsröhrchen bereitgestellt und in jedes, mit Ausnahme des ersten, 0,05 ml isotonische NaCl-Lösung vorgegeben. In das erste und zweite Röhrchen wurden je 0,05 ml inkomplettes Serum pipettiert. Der Inhalt des zweiten Röhrchens wurde durch 5-maliges Aufziehen und Ausblasen gemischt und davon 0,05 ml in das dritte Röhrchen überpipettiert. Auf diese Weise wurde fortlaufend überpipettiert und gemischt; aus dem letzten Röhrchen wurden 0,05 ml verworfen.

In jedes Röhrchen wurden 0,05 ml der entsprechenden Erythrozytensuspension gegeben und gemischt. Anschließend wurden die Testansätze 1 Minute bei 1000 U/Min. zentrifugiert und auf Agglutination abgelesen. Nach einer 20-

minütigen Inkubation der Ansätze im Wasserbad bei 37°C wurden sie dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Danach wurde in jedes Röhrchen 1 Tropfen AHG-Serum (der Firma Biotest) gegeben, anzentrifugiert und abgelesen.

Titerreihen mit gespaltenen Seren

Der Ansatz mit den gespaltenen Seren der Firmen Biotest, gamma biologicals und ORTHO DIAGNOSTICS wurde in gleicher Weise wie mit inkompletten Seren ausgeführt, mit dem Unterschied, daß die Inkubationszeit im Wasserbad 30 Minuten betrug.

Direkter Coombs-Test

Jede Erythrozytensuspension wurde durch direkten Coombs-Test (mit Coombs-Seren der Firmen DiaMed, Biotest, ORTHO DIAGNOSTICS und Molter) auf Auto-Antikörper hin untersucht, um eine falsch positive Reaktion im AHG-Ansatz auszuschließen.

Die Erythrozyten wurden dreimal in physiologischer Kochsalzlösung gewaschen; nach Zugabe des Coombs-Serums wurde anzentrifugiert und abgelesen.

2.3 Testkontrollen

1. Positivkontrollen: An jedem Testtag wurden die drei inkompletten und die drei gespaltenen Seren mit je 6 Rh-positiven Blutproben und die drei kompletten Seren mit je 1 Rh-positiven Probe getestet.

2. Die Reaktivität der AHG-Seren (= Coombs-Seren) der Firmen DiaMed, Biotest, ORTHO DIAGNOSTICS und Molter wurde mit Coombskontrollzellen überprüft:

Zunächst wurde 1 Tropfen Coombskontrollzellen dreimal gewaschen, danach 1 Tropfen Coombs-Serum zugefügt, anschließend anzentrifugiert und abgelesen.

Danach wurde der direkte Coombs-Test (d.C.) mit den vier obengenannten Coombs-Seren durchgeführt:

Jede Erythrozytensuspension wurde durch 4-fachen direkten Coombs-Test (mit den vier obengenannten Coombs-Seren) auf Autoantikörper untersucht.

2.4 Bewertungssystem der Ergebnisse

Die untersuchten Blutproben stammten alle aus dem Routinelabor. Für Reaktivitätsvergleiche wurden mit den antikörperhaltigen Testseren geometrische Verdünnungsreihen in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Verglichen wurden die Score-Werte der entsprechenden Reaktionen.

Kommerziell erhältliche Reagenzien wurden entsprechend den angegebenen Gebrauchsanleitungen verwendet.

Zur Bewertung der Agglutinationsstärke der verschiedenen Ansätze wurde neben dem Titer der geometrischen Verdünnungsreihe folgendes Score-System verwendet:

Agglutinationsstärke	Punkte
++++	10
+++(+)	9
+++	8
++(+)	6
++	5
+(+)	4
+	3
(+)	1

Da der Gesamtscore einer Titerreihe mehr Aussagekraft hat als die Angabe des Titters, wurde als Vergleichsgröße nur der Score verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich der Reaktionsstärken von frischen und tiefgefrorenen Erythrozyten

8 D^U-Proben wurden sowohl frisch als auch nach Tiefgefrieren und Wiederauftauen auf ihre Reaktionsstärken hin getestet. Dabei zeigte sich bei der Verwendung von inkompletten Seren eine Reaktionsminderung von 12% und bei den gespaltenen Seren von 13% (Tab. 4).

	frisch	nach Tieffrieren	Reaktions- minderung
ink. 1)	D ²⁾ 31,5	26,6	
	B ²⁾ 28,3	25,75	12
	M ²⁾ 34,8	31	
	$\bar{x}$ 31,5	28,1	
gesp. 1)	B ²⁾ 23,7	23,4	
	g ²⁾ 31	24,9	13
	A ²⁾ 30,1	25,2	
	$\bar{x}$ 28,25	24,5	

1) Ablesung nach AHG-Zugabe

2) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals,
A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

Tab. 4: Summe der Reaktionsscores bei der Bestimmung des Rh-Faktors D^U mit inkompletten (= ink.) und gespaltene (= gesp.) Seren aus frischen und tiefgefrorenen Blutproben im Vergleich - Reaktionsminderung der Score - Mittelwerte in %.

3.2 Reaktionen der D^U-Erythrozyten (n = 89) mit allen Seren, nach Phänotypen untergliedert

3.2.1 Phänotyp CcD^UEe (n = 37)

Die Reaktion mit kompletten und gespaltenen Seren (ohne Zusätze bei 37°) war in allen Fällen negativ. Mit inkompletten Seren zeigten sich mit 16 Proben positive, mit 8 Proben negative Reaktionen; in 13 Fällen reagierten die Blutproben nicht mit allen 3 inkompletten Seren positiv (Tab. 6).

Sowohl die inkompletten als auch die gespaltenen Seren reagierten im AHG-Test mit allen Proben positiv.

3.2.2 Phänotyp CcD^UEe (n = 4)

Die Reaktion mit kompletten und gespaltenen (ohne Zusätze bei 37°C) Seren war in allen Fällen negativ. In 3 Fällen war die Reaktion mit 2 von 3 inkompletten Seren positiv, in einem Fall mit allen inkompletten Seren negativ.

Im AHG-Test zeigten alle Proben dieses Phänotyps positive Reaktionen mit allen inkompletten und gespaltenen Seren.

3.2.3 Phänotyp ccD^UEe (n = 16)

Bis auf zwei Ausnahmen (Nr. 45 und 57) reagierten die Blutproben dieses Phänotyps mit allen kompletten und gespaltenen Seren (ohne Zusätze bei 37°C) negativ. Probe Nr. 45 reagierte mit einem von drei kompletten Seren positiv und mit allen gespaltenen Seren negativ. Probe Nr. 57 reagierte mit zwei von drei kompletten und allen gespaltenen Seren deutlich positiv. Die inkompletten Seren zeigten mit 4 Proben positive und mit 6 Proben negative Reaktionen; in 6 Fällen reagierten die Blutproben nicht mit allen 3 inkompletten Seren positiv. (Tab. 8).

15 Proben zeigten positive Reaktionen mit allen inkompletten und gespaltenen Seren im AHG-Test; 1 Probe (Nr. 55) reagierte im AHG-Test nicht mit allen inkompletten und gespaltenen Seren positiv.

3.2.4 Phänotyp ccD^Uee (n = 8)

Die Reaktion mit kompletten und gespaltenen (ohne Zusätze bei 37°C) Seren war in allen Fällen negativ. Die inkompletten Seren zeigten mit allen Proben positive Reaktionen.

Sowohl die inkompletten als auch die gespaltenen Seren reagierten im AHG-Test mit allen 8 Proben positiv.

3.2.5 Phänotyp ccD^UEE (n = 1)

Keine Reaktion mit inkompletten, kompletten und gespal-

tenen Seren (ohne Zusätze bei 37°C). Dagegen positive Reaktionen mit allen inkompletten Seren im AHG-Test, jedoch nicht mit gespaltenen Seren.

3.2.6 Phänotyp CCD^Uee ((n = 23)

7 Proben reagierten mit allen kompletten und gespaltenen Seren (ohne Zusätze bei 37°C) negativ:

- 1 Probe (Nr. 82) zeigte eine positive Reaktion mit 1 von 3 kompletten und keine Reaktion mit den 3 gespaltenen Seren.
- 1 Probe (Nr. 81) reagierte negativ mit allen kompletten und positiv mit allen gespaltenen Seren.
- Mit 1 Probe (Nr. 87) ergaben sich Agglutinationen mit 2 von 3 kompletten und 2 von 3 gespaltenen Seren.
- 13 Proben (Tab. 11) zeigten positive Reaktionen mit 1 oder 2 von 3 kompletten und mit allen 3 gespaltenen Seren.

Die Reaktion mit inkompletten Seren war in 19 Fällen mit allen 3 Seren, in einem Fall mit 1 von 3 Seren positiv und in 3 Fällen mit allen 3 Seren negativ.

Im AHG-Test reagierten 22 Proben mit allen inkompletten und gespaltenen Seren positiv; 1 Probe (Nr. 86) reagierte im AHG-Test nur mit den 3 inkompletten Seren positiv, mit den 3 gespaltenen Seren dagegen negativ.

3.3. Vergleich der Reaktionen mit kompletten und gespaltenen Seren

Mit 97% der D^U-Proben (86/89) reagierten die kompletten und gespaltenen Seren gleich (Abb. 13a - 18 a).

- 71 Proben reagierten negativ mit allen kompletten und gespaltenen Seren (ohne Zusätze bei 37°C).
- 15 Proben zeigten mit den kompletten und gespaltenen Seren nicht mit allen 3 getesteten Seren gleiche Reaktionen:

Während bei den kompletten Seren stets nur 1 oder 2 von 3 Seren positiv reagierten (Tab. 8 u. 11), zeigten von den gespaltenen Seren mit einer Ausnahme (Nr. 87) alle 3 Seren positive Reaktionen.

Mit 3 der getesteten Proben reagierten die kompletten und die gespaltenen Seren unterschiedlich (Abb. 13a - 18a):

- 2 Proben (Nr. 45 und Nr. 80) reagierten mit je 1 von 3 kompletten Seren positiv und mit allen 3 gespaltenen Seren negativ.
- In einem Fall (Nr. 81) zeigten sich mit den gespaltenen Seren deutliche Agglutinationen, während sich mit den kompletten Seren keine Reaktion ergab.

3.4 Vergleich der Reaktionen mit inkompletten und gespaltenen Seren

Bei 98% der D^U-Blutproben (87/89) ergaben sich mit inkompletten und gespaltenen Seren im AHG-Test gleiche Reaktionen (Abb. 13b - 18b):

- In 86 Fällen reagierten die inkompletten und gespaltenen Seren gleich positiv.
- In einem Fall (Nr. 55) reagierten von den inkompletten Seren nur 2 von 3 und von den gespaltenen nur 1 von 3 Seren positiv.

Mit 2 Blutproben (Nr. 66 und Nr. 86) reagierten die inkompletten und gespaltenen Seren im AHG-Test unterschiedlich (Abb. 13b - 18b):

Während alle 3 inkompletten Seren positive Reaktionen zeigten, reagierten alle 3 gespaltenen Seren negativ.

Vergleich der Mittelwerte aus den Reaktionen der D^U -Blutproben ($n = 89$) mit den 3 inkompletten und den 3 gespaltenen Seren, jeweils nach AHG:

$\bar{x}$ mit inkompletten Seren: 23,7

$\bar{x}$ mit gespaltenen Seren: 20,2

3.5 Häufigkeitsverteilung der Reaktionsstärken aller D^U -Blutproben mit inkompletten und gespaltenen Seren

Trägt man die Score-Mittelwerte mit den 3 inkompletten und den 3 gespaltenen Seren ihrer Häufigkeit nach in Koordinatensysteme ein, so ergeben sich in etwa Normalverteilungen (Abb. 5 und 6).

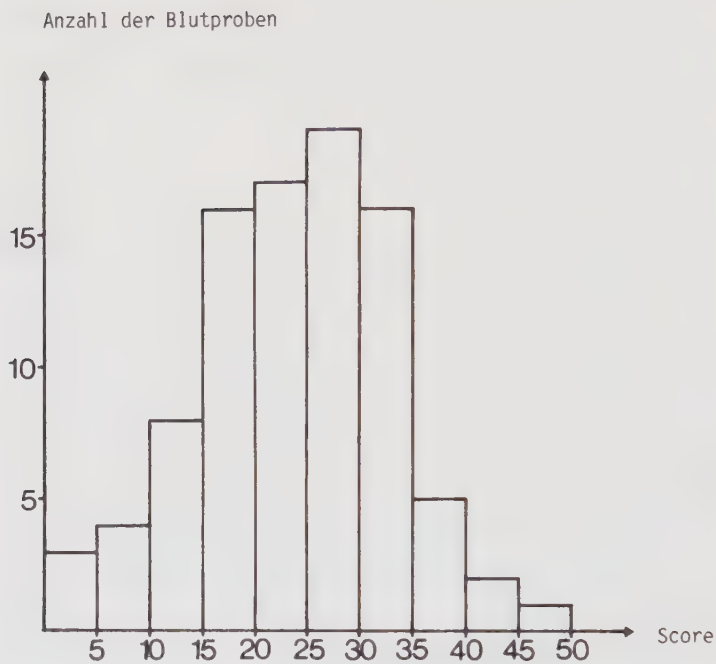


Abb. 5: Ergebnisse der D^uErythrozyten aller Mosaik
mit inkompletten Seren nach AHG-Zugabe. Alle
Werte sind Mittelwerte.

Anzahl der Blutproben

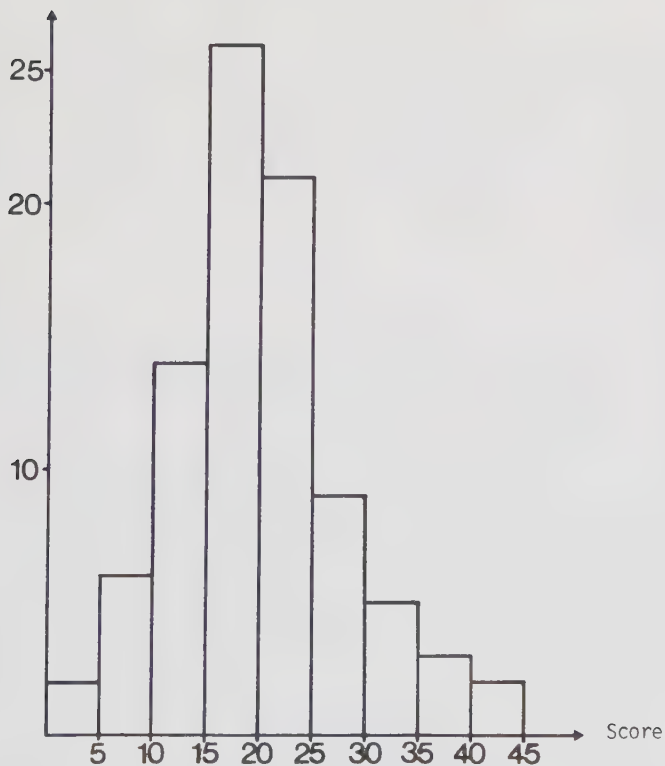


Abb 6: Ergebnisse der D^u-Erythrozyten aller Mosaik
mit gespaltenen Seren nach AHG-Zugabe. Alle
Werte sind Mittelwerte.

3. 6 Familienuntersuchung und Reaktionsvergleich mit Rh-positiven Blutproben

Aufgrund der auffallend schwachen, dreifach nachgeprüften Reaktion der Probe Nr. 86 des Phänotyps CCD^Uee wurde eine Familienuntersuchung durchgeführt.

Dabei fand sich kein weiteres D^U (Tab. 5).

		ik	ik (AHG)	gesp.	gesp. (AHG)	kompl.
Probantin S., B	CCD ^U ee	--	4,3	--	---	--
Vater	, B CCDee	6,6	30,3	6,3	29,0	4,8
Mutter	, A CcDEe	7,0	30,3	5,6	25,3	3,5
Bruder E.	, A CCDee	5,0	26,0	4,3	22,6	2,0
Bruder Ch.	, O CcDEe	11,6	34,3	7,6	33,0	5,5

Tab. 5: Mittelwerte der Reaktionen der Familie S. mit je 3 inkompletten (= ik) und 3 gespaltenen (gesp.) Seren vor und nach AHG und mit 3 kompletten (= kompl.) Seren.

Vergleich der Reaktionen inkompletter, gespaltener und kompletter Seren mit Rh-positiven Blutproben:

Score-Mittelwert mit inkompletten Seren (n = 114) : 9,11

Score-Mittelwert mit gespaltenen Seren (n = 114) : 7,88

Score-Mittelwert mit kompletten Seren (n = 19) : 6,5

3.7 Sämtliche Ergebnisse mit D^U-Erythrozyten (n = 89) in Tabellen und Graphiken, untergliedert nach Phänotypen

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett ¹⁾			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
1	9	12	8	9,6	32	42	64	46					32	44	58	44,6				
2	-	-	-	-	22	19	22	21					22	23	18	21				
3	3	6	6	5	35	42	56	44,3					34	39	23	32				
4	5	5	4	4,6	31	21	41	31					1	13	16	10				
5	5	-	-	1,6	27	28	33	29,3					16	22	20	19,3				
6	5	3	5	4,3	19	16	26	20,3					20	19	20	19,6				
7	1	1	1	1	31	24	35	30					17	23	16	18,6				
8	1	4	-	1,5	26	27	34	29					19	14	14	15,6				
9	3	3	3	3	37	25	29	30,3					16	16	16	16				
10	-	4	3	2,3	22	17	37	25,3					24	23	27	24,6				
11	-	-	-	-	15	13	14	14					13	15	15	14,3				
12	4	5	-	3	28	31	36	31,6					25	24	27	25,3				
13	-	-	-	-	22	22	23	22,3					16	18	20	18				
14	1	3	-	1,3	21	19	20	20					15	20	17	17,3				

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals, A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

Tab. 6: Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps Ccd^{lee} (n = 37) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte ($= \bar{x}$) daraus.

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett ¹⁾			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
15	1	3	3	2,3	26	19	25	23,3					14	18	23	18,3	-	-	-	-
16	-	-	-	-	22	19	20	20,3					13	16	17	15,3				
17	-	-	-	-	19	16	19	18					17	18	16	17				
18	4	-	-	1,3	18	16	19	17,6					17	17	16	16,6				
19	-	-	3	1	15	16	18	16,3					14	16	22	17,3				
20	-	3	3	2	24	23	27	24,6					20	22	28	23,3				
21	3	3	3	3	23	18	35	25,3					13	20	23	18,6				
22	3	3	3	3	15	11	22	16					11	11	10	10,6				
23	3	3	-	2	21	20	33	24,6					17	22	28	22,3				
24	6	5	5	5,3	41	31	43	38,3					29	27	29	28,3				
25	3	3	3	3	36	37	45	39,3					44	28	42	38				
26	4	5	5	4,6	28	27	24	26,3					23	23	24	23,3				
27	3	3	1	2,6	27	22	23	24					17	20	16	17,6				
28	1	-	-	0,3	18	19	28	21,6					15	17	20	17,3				

Fortsetzung - Tab. 6: (Erläuterungen s. Seite 35)

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
29	3	3	1	2,3	23	25	29	25,6					14	20	20	18				
30	1	1	1	1	27	16	35	26					25	26	20	23,6				
31	3	3	-	2	23	21	25	23					17	19	18	18				
32	-	-	-	-	17	16	12	15					10	13	12	11,6				
33	3	-	-	1	16	21	23	20					10	10	13	11				
34	-	-	-	-	22	16	17	18,3					19	18	19	18,6				
35	-	-	-	-	13	10	11	11,3					10	16	12	12,6				
36	1	3	1	1,6	12	10	15	12,3					10	11	12	11				
37	1	-	-	0,3	14	16	16	15,3					16	14	11	13,6				

Fortsetzung - Tab. 6:

(Erläuterung siehe Seite 35)

Probe Nr.	inkomplett			inkomplett (AHG)			gespalten			gespalten (AHG)			komplett 1)		
	D	B	M $\bar{x}$	D	B	M $\bar{x}$	B	g	A $\bar{x}$	B	g	A $\bar{x}$	D	B	M $\bar{x}$
38	-	-	-	9	10	21	13,3			1	1	1	-	-	-
39	1	1	0,6	39	25	39	34,3			27	28	40	31,6		
40	1	1	0,6	18	11	11	13,3			14	14	11	13		
41	-	1	0,6	25	16	21	20,6			10	18	6	11,3		

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals, A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

Tab. 7: Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps CcD^uEe (n = 4) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte (= $\bar{x}$) daraus.

[illegible]

Tab.: 8:

Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps ccd^UEe (n = 16) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte (= $\bar{x}$) daraus.

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma Biologicals, A = Akotec von Ortho Diagnostics

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett 1)			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
58	1	3	1	1,6	18	19	24	20,3					15	20	19	18				
59	5	4	4	4,3	34	30	31	31,6					21	33	22	25,3				
60	1	3	3	2,3	29	24	34	29					18	29	20	22,3				
61	4	4	4	4	24	15	26	21,6					23	34	31	29,3				
62	5	4	4	4,3	34	22	35	30,3					7	18	26	22				
63	3	3	3	3	29	25	27	27					17	27	18	20,6				
64	4	4	5	4,3	28	25	43	32					32	33	29	31,6				
65	5	5	5	5	33	39	49	40,3					27	28	35	30				

Tab.: 9:

Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps $ccD^{U}ee$ ($n = 8$) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte ($= \bar{x}$) daraus.

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals, A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

66	-	-	-	-	6	7	7	6,6					-	-	-	-			
----	---	---	---	---	---	---	---	-----	--	--	--	--	---	---	---	---	--	--	--

Tab. 10:

Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps $ccD^{U}EE$ ($n = 1$) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte ($= \bar{x}$) daraus

1) Erläuterungen s.o.

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett ¹⁾			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
67	6	5	4	5	33	29	36	32,6	3	3	5	3,6	20	28	26	24,6	4	-	1	1,6
68	3	4	4	3,6	22	28	24	24,6	3	3	4	3,3	22	20	19	20,3	4	3	-	2,3
69	8	9	5	7,3	29	26	22	25,6	3	3	4	3,3	26	27	21	24,6	3	3	-	2
70	6	6	4	5,3	24	26	31	27	3	5	5	4	22	24	20	22	4	3	-	2,3
71	5	5	4	4,6	30	33	26	29,6	4	4	5	4,3	20	23	21	21,3	4	4	-	2,6
72	5	5	5	5	24	26	28	26	3	4	5	4	22	24	30	25,3	3	4	-	2,3
73	-	-	-	-	10	7	10	9	-	-	-	-	9	7	7	7,6	-	-	-	-
74	1	-	-	0,3	13	11	15	13	-	-	-	-	7	3	6	5,3	-	-	-	-
75	5	5	3	4,3	27	26	30	27,6	-	-	-	-	19	19	23	20,3	-	-	-	-
76	3	3	1	2,3	20	14	12	15,3	-	-	-	-	15	32	24	23,6	-	-	-	-
77	5	4	6	5	35	31	37	34,3	1	3	4	3,6	29	36	32	32,3	1	-	-	0,3
78	10	5	4	6,3	44	29	44	39	4	4	4	4	26	46	44	38,6	1	-	-	0,3
79	-	-	-	-	5	10	11	8,6	-	-	-	-	5	8	10	7,6	-	-	-	-
80	5	5	4	4,6	36	27	44	35,6	-	-	-	-	30	30	31	30,3	-	1	-	0,3
81	5	4	4	4,3	24	31	26	27	4	3	5	4	25	26	29	26,6	-	-	-	-

Tab. 11:

Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps $CCD^{D'ee}$ ($n = 23$) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte ($= \bar{x}$) daraus.

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals, A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

Probe Nr.	inkomplett				inkomplett (AHG)				gespalten				gespalten (AHG)				komplett ¹⁾			
	D	B	M	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	B	g	A	$\bar{x}$	D	B	M	$\bar{x}$
82	3	3	3	3	22	22	16	20	-	-	-	-	16	21	18	18,3	3	-	-	1
83	4	8	3	5	33	31	38	34	3	3	3	3	21	21	32	24,6	3	-	-	1
84	5	8	5	6	28	40	34	34	3	3	3	3	29	41	42	37,3	3	1	-	1,3
85	6	8	8	7,3	38	39	36	37,6	3	3	3	3	20	26	28	24,6	3	3	-	2
86	-	-	-	-	4	1	6	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
87	5	8	4	5,6	25	29	27	27	-	3	3	2	21	25	28	24,6	3	3	-	2
88	3	3	3	3	20	22	22	21,3	-	-	-	-	14	17	18	16,3	-	-	-	-
89	4	5	4	4,3	30	27	23	26,6	3	3	3	3	17	22	20	19,6	3	3	-	2

Tab. 11: Fortsetzung : Einzelwerte der Reaktionen von Blutproben des Phänotyps CCD_{Uee} (n = 23) mit drei inkompletten und drei gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit drei kompletten Seren sowie jeweils die Mittelwerte (= $\bar{x}$) daraus.

1) D = DiaMed, B = Biotest, M = Merz & Dade, g = gamma biologicals, A = Akotec von ORTHO DIAGNOSTICS

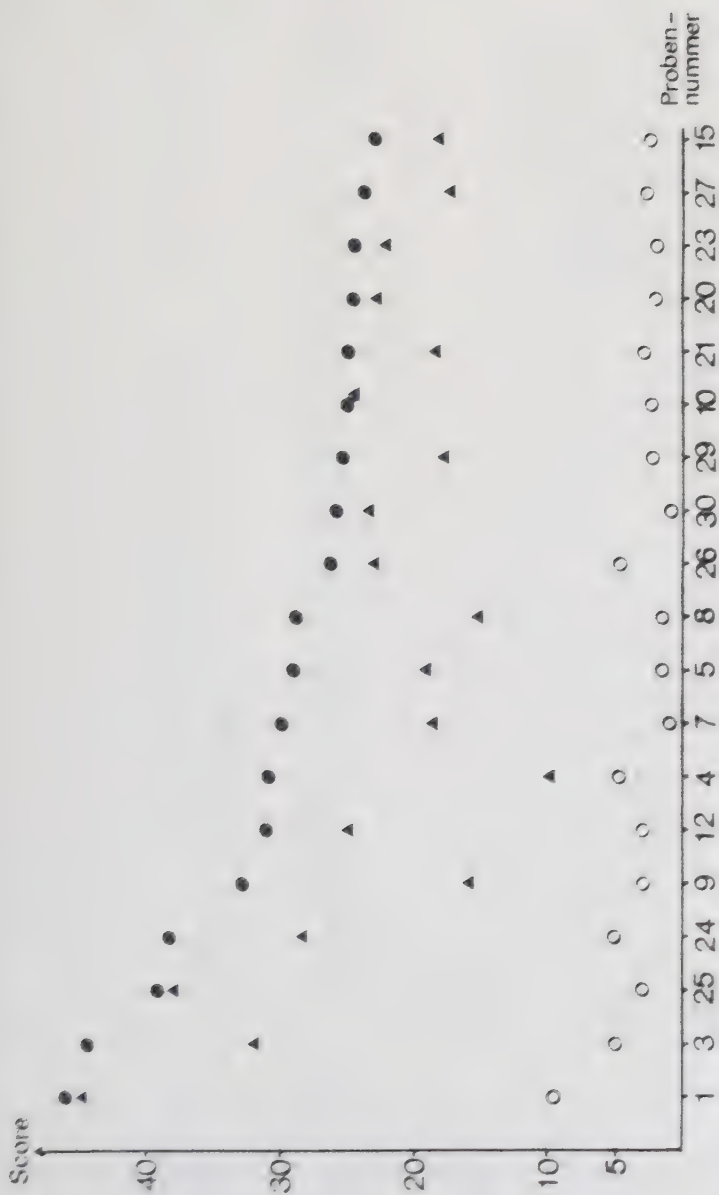


Abb. 7a: Phänotyp CcD^uee

Graphischer Vergleich der Mittelwerte mit 3 inkompletten und 3 gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit 3 kompletten Seren.

○ = inkomplett,

● = inkomplett (AHG),

▲ = gespalten (AHG)

keine Reaktion mit gespaltenen und kompletten Seren ohne Zusätze bei 37° C.

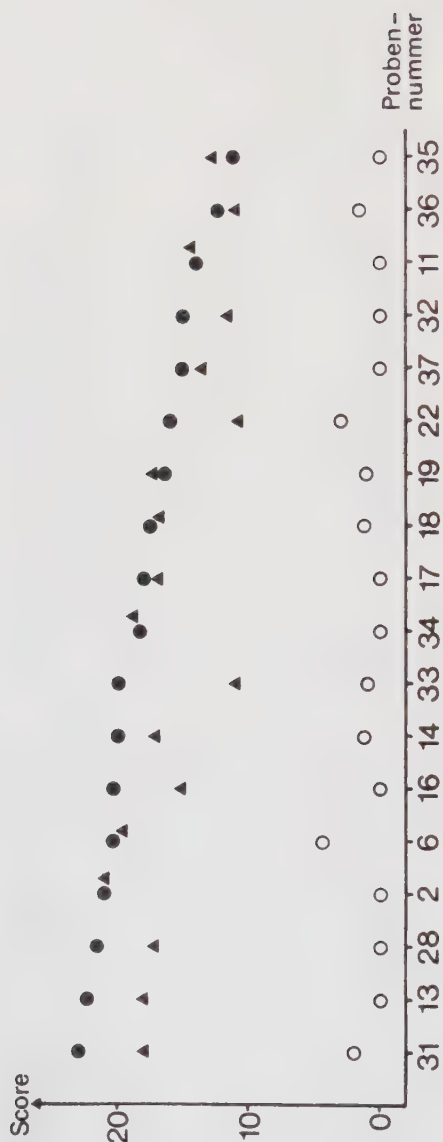
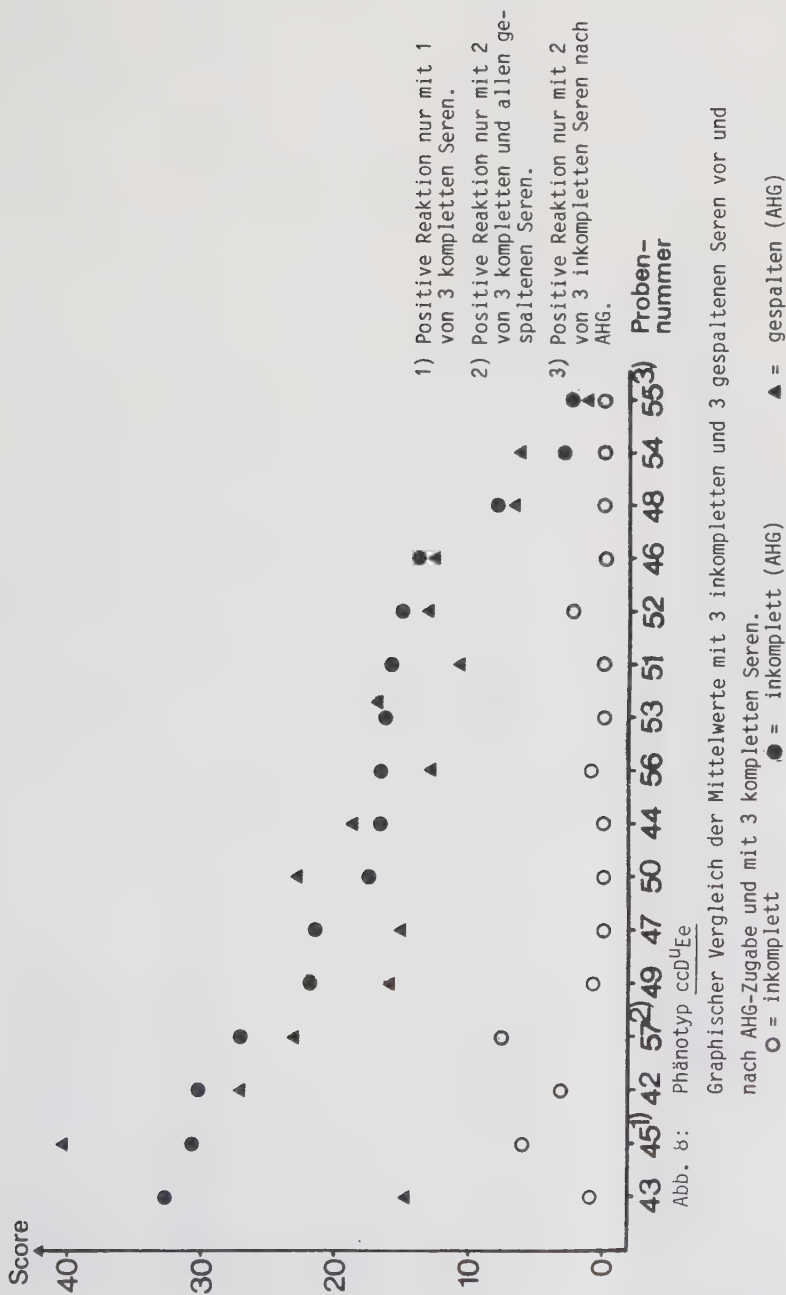


Abb. 7b: Phänotyp CcD^{Uee}

(Erläuterungen s. Abb. 7a, Seite 43)



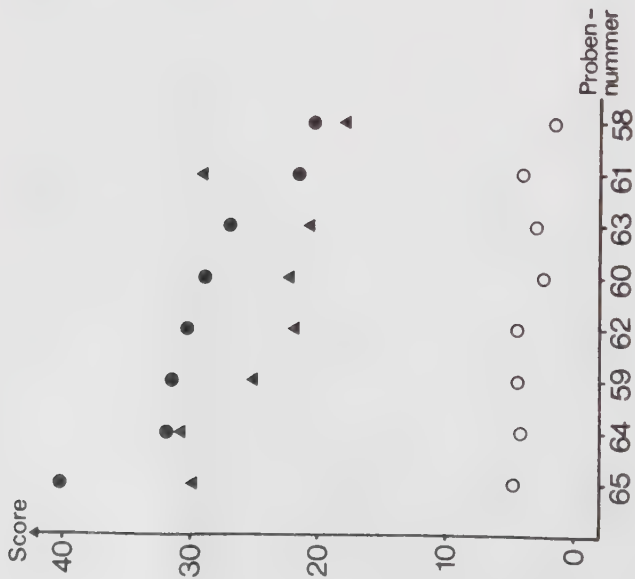


Abb. 9: Phänotyp ccD^uEe

Graphischer Vergleich der Mittelwerte mit 3 inkompletten und 3 gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit 3 kompletten Seren.

O = inkomplett,
● = inkomplett (AHG)
▲ = gespalten (AHG)

keine Reaktion mit gespaltenen und kompletten Seren ohne Zusätze bei 37° C.

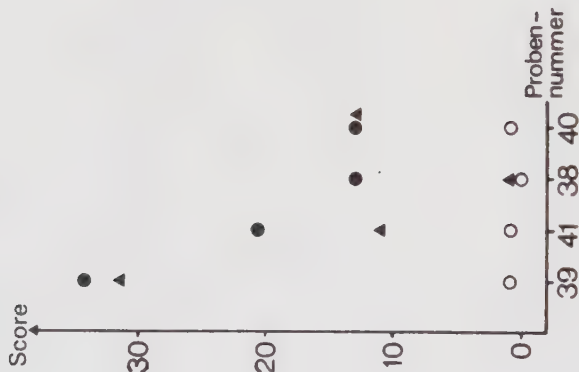


Abb. 10: CcD^uEe

Graphischer Vergleich der Mittelwerte mit 3 inkompletten und 3 gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit 3 kompletten Seren.

O = inkomplett
● = inkomplett (AHG)
▲ = gespalten (AHG)

keine Reaktion mit gespaltenen und kompletten Seren ohne Zusätze bei 37° C.

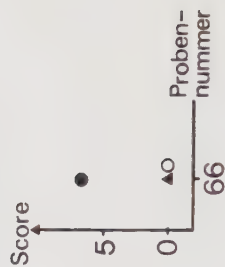


Abb. 11: ccD^uEe

Graphischer Vergleich der Mittelwerte mit 3 inkompletten und 3 gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit 3 kompletten Seren.

O = inkomplett
● = inkomplett (AHG)
▲ = gespalten (AHG)

keine Reaktion mit gespaltenen und kompletten Seren ohne Zusätze bei 37° C.

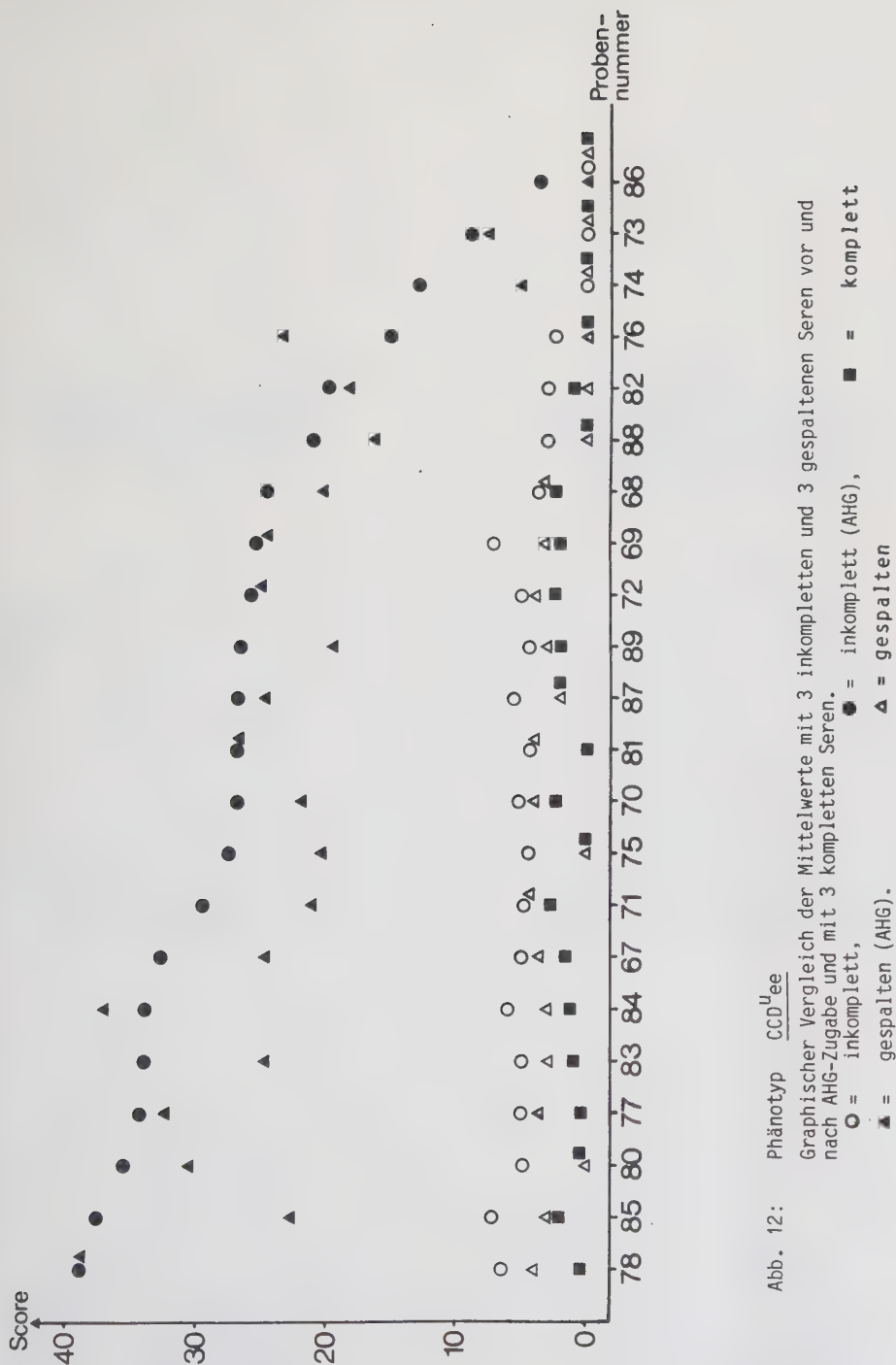


Abb. 12: Phänotyp CCD^{Uee}
 Graphischer Vergleich der Mittelwerte mit 3 inkompletten und 3 gespaltenen Seren vor und nach AHG-Zugabe und mit 3 kompletten Seren.
 ○ = inkomplett, ● = inkomplett (AHG), ■ = komplett
 ▲ = gespalten (AHG), ▲ = gespalten

gespalten

+	-	
-	-	+ komplett
-	37	

Abb. 13a: Vierfeldertafel

Reaktionen der gespaltenen und kompletten Seren (ohne Zusätze bei 37°C) mit Blutproben des Phänotyps CcD^UEe (n = 37).

gespalten

+	-	
37	-	+ inkomplett
-	-	

Abb. 13b: Vierfeldertafel

Reaktionen der gespaltenen und inkompletten Seren nach AHG mit Blutproben des Phänotyps CcD^UEe (n = 37).

gespalten

+	-	
-	-	+ komplett
-	4	

Abb. 14a:

Phänotyp CcD^UEe (n = 4)

*Reaktionen mit gespaltenen und kompletten Seren (ohne Zusätze bei 37°C).

gespalten

+	-	
4	-	+ inkomplett
-	-	

Abb. 14b:

Phänotyp CcD^UEe (n = 4)

**Reaktionen mit gespaltenen und inkompletten Seren nach AHG.

+	-	
1	1	
-	14	

Abb. 15a:

Phänotyp ccD^UEe (n = 16)

*Erläuterung s.o.

+	-	
16	-	+
-	-	

Abb. 15b:

Phänotyp ccD^UEe (n = 16)

** Erläuterung s.o.

gespalten

+	-	
-	-	+
-	8	-

komplett

Abb. 16 a:

Phänotyp ccD^Uee ($n = 8$)

* Erläuterungen S. 48

gespalten

+	-	
8	-	+
-	-	-

inkomplett

Abb. 16 b:

Phänotyp ccD^Uee ($n = 8$)

** Erläuterungen S. 48

gespalten

+	-	
-	-	+
-	1	-

komplett

Abb. 17 a:

Phänotyp ccD^UEE ($n = 1$)

* Erläuterungen S. 48

gespalten

+	-	
-	1	+
-	-	-

inkomplett

Abb. 17 b:

Phänotyp ccD^UEE ($n = 1$)

** Erläuterungen S. 48

gespalten

+	-	
13	2	+
1	6	-

komplett

Abb. 18 a:

Phänotyp CCD^Uee ($n = 23$)

* Erläuterungen S. 48

gespalten

+	-	
22	1	+
-	-	-

inkomplett

Abb. 18 b:

Phänotyp CCD^Uee ($n = 23$)

** Erläuterungen S. 48

4. Diskussion

4.1 Die D^U-Subklassen und ihr serologisches Verhalten mit den gespaltenen Seren

4.1.1 Ein D-Gen, das eine verminderte Anzahl von vollständigen D-Antigenen produziert.

Familienstudien zeigten, daß die Anzahl der Antigenorte auf den Erythrozyten anscheinend unter strenger genetischer Kontrolle steht. Dementsprechend ergaben die ersten Familienuntersuchungen von D^U-Probanden (27, 29), daß D^U-Varianten bei den Angehörigen einer Familie oft identische serologische Eigenheiten zeigen, während sich die serologischen Reaktionen von D^U-Probanden aus verschiedenen Familien meist stark unterscheiden. Man schloß daraus, daß es sich bei den D^U-Varianten um eine ganze Gruppe von Allelen handelt, die wie die anderen Rhesusfaktoren vererbt werden. Diese D^U-Allele unterscheiden sich vom D-Allel durch eine verminderte Anzahl anscheinend normaler D-Antigene auf den Erythrozyten. Während man bei normalen D-positiven Probanden etwa 10.000 Antigene pro Erythrozyt findet, wurde bei D^U-Familienuntersuchungen eine weit geringere Anzahl von Antigenen auf den D^U-Erythrozyten gefunden. In einem Fall (3) wird von zwei Schwestern berichtet, die nur 110 bzw. 174 D-Antigene/Erythrozyt aufwiesen (es handelt sich um normale D-Antigene).

Aufgrund unserer Untersuchungen kann bestätigt werden, daß D^U -Blutproben serologisch keine einheitliche Reaktionsstärke zeigen, sondern sich im Sinne einer Normalverteilung um einen Mittelwert gruppieren (Abb. 5 + 6). Diese Verteilung der Reaktionsstärken ergibt sich mit gespaltenen Seren gleichermaßen wie mit inkompletten Seren nach AHG-Test (Abb. 5 + 6). Das bedeutet, die gespaltenen Seren bringen keine zusätzliche Information darüber, ob es sich bei einem D^U -Blut um ein genetisch bedingtes D^U handelt.

4.1.2 Suppression von D durch Geninteraktion

Es ist bekannt, daß der quantitative Ausdruck eines Genproduktes durch die Position eines anderen Gens oder Genkomplexes verändert werden kann. So wurde z.B. nachgewiesen, daß der Genkomplex r^{++} ("cdE") mehr E produziert als der Komplex R^2 ("cDE"); ebenso scheint "D" in cis-Position (auf dem homologen Chromosom) generell die Produktion von C, E oder e zu unterdrücken (20). Die gleichen Untersucher wiesen auch nach, daß der Genotyp "CDe/cde" mehr C produziert als der Genotyp "CDe/cDE" und der Typ "cDE/cde" mehr E hervorbringt als der Typ "CDe/cDE".

Im Jahre 1952 stellte Ceppelline (4) bei der Auswertung einer Familienuntersuchung fest, daß "das mütterliche Chromosom "CDe" beim Kind ein normales D-Antigen hervorzubringen scheint, wenn es mit dem

väterlichen Chromosom "cde" gepaart ist, aber ein D^U -Antigen, wenn es mit dem väterlichen "Cde" gepaart ist. Ceppelline stellte zur Diskussion, daß der "Cde" - Genkomplex in Trans-Position zu D (auf dem Locus des Partnerchromosoms) durch Geninteraktion die Ausprägung des D-Antigens hemmt.

Zuvor schon war mehreren Autoren aufgefallen, daß unter den als D^U bestimmten Spendern unverhältnismäßig viele den Phänotyp CCD^U_{ee} hatten. Sie schrieben diesem Phänotyp den Genotyp CD^U_e/Cde zu, da die Alternative CD^U/CD^U_e extrem selten ist. Eine befriedigende Erklärung für das gehäufte Vorkommen des Phänotyps CCD^U_{ee} konnten sie jedoch nicht anbieten.

Ceppellini et al (5) gingen diesem Problem in ausgiebigen Familienuntersuchungen nach. Sie benutzten für jeden Ansatz mindestens 5 agglutinierende Anti-D-Seren im Kochsalzmilieu (komplette Anti-D-Seren) und erstellten Titerreihen.

In einer Familie ergab der Phänotyp CCD^U_{ee} (Genotyp "CDe/Cde") in zwei Fällen einen ca. halb so starken Gesamtscore wie der Phänotyp CcDe (Genotyp "Cde/cDe"). Das bedeutet, die Reaktivität des D-Antigens, das vom selben CDe-Chromosom produziert wird, ist sehr unterschiedlich, je nachdem, ob es mit einem cde- oder mit einem Cde-Chromosom gepaart ist.

Während einige wenige "D/Cde"-Personen unterschiedlichen Anti-D-Seren gegenüber deutlich unterschiedliche Reaktionen zeigten (eine typische Eigenschaft

von echten D^U-Phänotypen), reagierten die meisten mit allen Anti-D-Seren schwächer als normales D-positives Blut (abb. 5).

Ceppelline et al schlossen aus ihren Untersuchungen (es wurden 15 Cde/CDe, 3 Cde/cDe und 1 Cde/cDe Genotypen untersucht), daß ein Cde-Gen in Transposition zu einem normalen D einen deutlich supprimierten Einfluß auf den quantitativen Ausdruck des D-Antigens hat.

Ob die Interaktion zwischen einem Gen und einem anderen oder zwischen einem Genprodukt und einem anderen stattfindet, ist nicht bekannt.

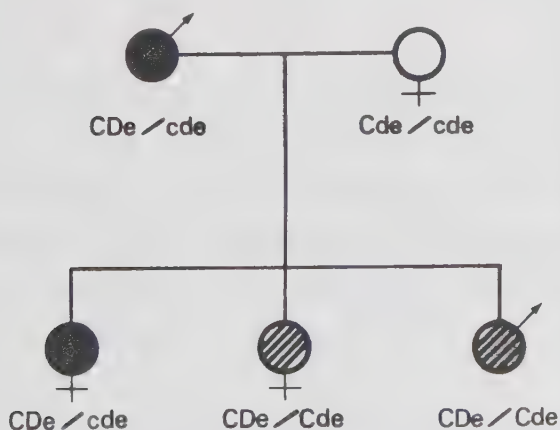


Abb. 19: ● = D-positives Blut normaler Reaktionsstärke nach Titration mit mehreren Anti-D-Seren.
 ⊗ = D-positives Blut, das bei Titration deutlich schwächer reagiert als der Durchschnitt der D-positiven Blutproben.
 ○ = D-negatives Blut (5).

4.1.3 Fehlen eines Teils des D-Mosaiks

In seltenen Fällen fand man im Serum von D^U -Probanden Antikörper, die von Anti-D nicht unterscheidbar waren (1, 42), gegenüber D^U -Blutproben jedoch sehr unterschiedliche Reaktivität aufwiesen. Man ging davon aus, daß diesen Personen ein Teil des normalen D fehlt, gegen den sie sich dann immunisieren.

Unger und Wiener (39) gingen diesem Problem nach. Sie nahmen an, daß das vollständige D-Antigen aus vier Teilen (A, B, C und D) bestünde und symbolisierten fehlende Teile mit kleinen Buchstaben (z.B.: Rh_1^C , Rh_1^{Cd} , Rh_2^b , usw.).

Während Negern und Weißen nur sehr selten eine der D-Komponenten A, B oder C fehlt, fand man bei ca. 50% aller D^U -Typen einen Mangel an einem oder mehreren dieser Einzelfaktoren (40).

Bei Kreuztests zwischen Erythrozyten und Seren von D- oder D^U -Personen mit Anti-D konnten Tippett und Sanger (38) sechs Reaktionsmuster unterscheiden (Gruppen I - VI).

4.1.4 Die Frage der Unterscheidbarkeit der D^U -Subklassen durch zusätzliche Verwendung von gespaltenen Seren

Eine serologisch einfach durchführbare Unterscheidung zwischen Positions- und Mosaik- D^U s wäre für die Blut-

gruppenroutine sehr wichtig, da Personen mit Mosaik-D^U sich gegen den fehlenden Teil immunisieren können, während Personen mit Positions-D^U sich nicht immunisieren können, da sie definitionsgemäß alle Teile eines normalen D-Antigens besitzen (14).

Die früher übliche Einteilung der D^U-Blutproben in "high-grade" und "low-grade" D^Us erwies sich auch in unseren Untersuchungen als nicht zutreffend. Entsprechend konnte die ebenfalls übliche Zuordnung von "high-grade" D^Us zu Positions-D^Us und von "low-grade" D^Us zu Mosaik-D^Us nicht bestätigt werden. Vielmehr ergaben sich fließende Übergänge zwischen schwachen und starken D^Us im AHG-Test mit inkompletten und gespaltenen Seren.

14 der 23 Blutproben des Phänotyps CCD^Uee und eine Probe des Phänotyps ccD^UEe zeigten auffallende Ergebnisse: Sie reagierten mit allen gespaltenen, aber nur mit einem Teil der kompletten Seren positiv im Gegensatz zu allen übrigen getesteten D^U-Blutproben, die mit allen gespaltenen und kompletten Seren negativ reagierten.

Unserer Meinung nach könnte es sich hier um sog. Positions-D^Us handeln, und zwar aus folgenden Gründen:

1. Mit einer Ausnahme findet sich diese auffallende Reaktion nur in der Gruppe der CCD^{Uee} , in der am ehesten mit Trans-Positions-Effekten zu rechnen ist. Prinzipiell ist ein C in Trans-Position zu D auch beim Phänotyp CcD^{Uee} möglich, aber bei einer prozentualen Häufigkeit des Genotyps CDe/cDe von 32,6 % im Vergleich zum Genotyp cDe/Cde von 0,05 % (24) doch sehr unwahrscheinlich. Außerdem hat nicht jedes C in Trans-Position zu D einen unterdrückenden Einfluß auf D.

In unseren Untersuchungen reagierten die 37 Proben des Phänotyps CcD^{Uee} mit allen gespaltenen und kompletten Seren negativ. Dies bedeutet unserer Meinung nach, daß sich in dieser Gruppe kein Stellungen- D^U oder zumindest kein reines Stellungen- D^U befand (mehrere supprimierende Effekte können sich addieren), was auch der statistischen Wahrscheinlichkeit entspricht.

2. Da reine Stellungen- D^U s normale, lediglich in der Reaktionsstärke abgeschwächte D-Antigene besitzen, sind sie erwartungsgemäß starke D^U s. Dies entspricht unseren Ergebnissen: Hätte man die Probe Nr. 16 des Phänotyps ccD^{Uee} und die 14 Proben des Phänotyps CCD^{Uee} nur mit gespaltenen Seren getestet, so wären sie als Rh-positiv ($ccDEe$ bzw. $CCDee$) klassifiziert worden. Lediglich die unvollständige Reaktion mit den kompletten Seren führte zur Bestimmung als D^U .
3. Obwohl die gespaltenen Seren bei den Positivkontrollen mit Rh-positivem Blut nur um 1,3 Score-Punkte (3.6) schwächer als die inkompletten Seren reagierten,

reagierten die gespaltenen Seren trotz z.T. starker Reaktionen der inkompletten Seren (z.B.: Nr. 1 CcD^Uee und Nr. 24 CcD^Uee) bis auf die genannten 15 Fälle negativ.

Das könnte unserer Meinung nach bedeuten, daß die gespaltenen Seren "echte" (Mosaik- oder genetisch bedingte) D^Us mit starker Reaktion eindeutig als solche im AHG-Test erkennen, während diese D^Us von den inkompletten Seren zum großen Teil als D klassifiziert werden.

"Unechte", starke (Stellungs-) D^Us hingegen werden nur von einigen kompletten Seren durch negative Reaktionen als D^U bestimmt, während sie von den gespaltenen Seren als D klassifiziert werden.

Es stellt sich natürlich die Frage, warum die kompletten Seren so unterschiedlich reagierten (Tab. 11), obwohl sie bei den Kontrollansätzen mit Rh-positiven Blutproben sehr einheitliche Reaktionsstärken zeigen.

Als mögliche Erklärung kommt in Frage, daß den stark reaktiven Seren IgG-Beimengungen über das erlaubte Maß hinaus beigegeben sind. In diesem Fall wäre das schwächer reaktive Serum ein reineres IgM-Serum als die beiden anderen.

Eine andere mögliche Erklärung ist, daß die schwächer reaktiven kompletten Seren zu stark verdünnte IgM-Seren sind oder einen Immunisierungsweg haben, der weniger IgM erzeugt.

Schlußfolgerung:

Die gespaltenen Seren erscheinen unserer Meinung nach geeignet, starke Stellungen- D^U s zu erkennen. Eine Differenzierung zwischen Mosaik- und genetisch bedingten D^U s war in unseren Untersuchungen nicht erkennbar.

4.2 D^U - ein Problem in der Transfusionsmedizin

4.2.1 Die Problematik der D^U -Bestimmung

Als Stratton im Jahre 1946 über einen Fall des neuen Allels D^U berichtete (35), nahm er noch an, D^U sei dem C-Allel C^W vergleichbar. Das D^U wirft jedoch wesentlich mehr Probleme auf als die Reihe der C-Allelen. Es gibt kein Anti-d-Serum und auch kein dem Anti- C^W vergleichbares Anti- D^U -Serum.

Die Tatsache, daß es kein spezifisches Anti- D^U -Serum gibt, erklärt die Umständlichkeit und Verschiedenheit der Nachweismethoden von D^U . Bis zur Entdeckung des Coombs-Testes versuchte man D^U -Zellen allein durch Testung mit verschiedenen Anti-D-Seren zu entdecken (35, 27).

Diese Methode war relativ ungenau, so daß später viele Untersucher den indirekten Coombs-Test (i.C.) oder seine Modifikationen, wie z.B. die Vorbehandlung der Erythrozyten mit proteolytischen Fermenten verwendeten (31,6).

Andere Autoren arbeiteten mit Polyvinylpyrrolidon und verschiedenen Mischungsverhältnissen von Rinderalbumin und Humanserum (15, 36). Grove-Rasmussen und Mitarbeiter

(11) versuchten einen Röhrchentest, bei dem jedoch nur ca. 50% der vorhandenen D^U entdeckt werden konnten. Bei einer Vergleichstudie mit Bromelin und PVP (26) konnten ungefähr 75% der D^U aufgedeckt werden. Die Fizin-Methode, die Giles (10) als gleich wertvoll wie den Coombs-Test beschrieb, wird von Sturgeon (37) als zu ungenau abgelehnt. Sturgeon (37) benutzte eine Mischung Antiserum mit dem Titer 1 : 128 und 25% Albumin, setzte die Erythrozyten mit einem Stäbchen zu, zentrifugierte und las das Ergebnis nach Zusatz von isotoner Kochsalzlösung direkt ab. Mittels dieser Methode kam er zu den gleichen Ergebnissen wie mit dem i.C. Aus dieser Übersicht der D^U -Testmethoden geht hervor, daß der i.C. die verlässlichsten Ergebnisse liefert und als Methode der Wahl zu betrachten ist. Absorption und Elution sind zwar sehr genau und verlässlich, als Routinemethoden aber zu aufwendig.

Da in unserer Bevölkerung die Frequenz des Chromosoms cDe nur 2% beträgt, kommt das Merkmal D bzw. D^U meist in Kombination mit C und E als Chromosom CDE, cDE oder CDe bzw. CD^UE , cD^UE oder CD^Ue vor. Das heißt, es liegt bei jedem Blutmuster mit dem Merkmal C oder E der Verdacht nahe, D^U könnte vorhanden sein.

In den "Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion" (30), aufgestellt vom Wissenschaftlichen Beirat der Bundesärztekammer, steht unter Ziffer 2.2.2.2:

"Das Rh-Merkmal D kann auch in unterschiedlich abgeschwächter Form als D^U vorkommen. Alle D-negativen Blutproben müssen auf das Vorhandensein der Merkmale C und E und - soweit eines dieser Merkmale vorhanden ist - auch auf D^U untersucht werden".

Da in seltenen Fällen ein schwaches D^U -Blutmuster auch von einem potenten inkompletten Anti-D-Serum im i.C. nicht erkannt wird, schlagen Race et al (28) vor, beim D^U - Test stets zwei verschiedenen inkomplette Seren zu verwenden.

Die Abgrenzung von starken D^U -Formen gegen D-positives Blut erfolgt durch den Test mit mehreren kompletten Anti-D-Seren.

4.2.2 Die Verwendung gespaltener Seren zur D^U -Bestimmung

Bei alleiniger Verwendung gespaltener Seren wären von den 89 getesteten D^U -Blutproben

- 2 Blutproben (Nr. 66 und Nr. 86 = 2%) als D-negativ bestimmt worden,
- 72 Blutproben (= 81%) als D^U bestimmt worden,
- 15 Blutproben (= 17%) als D-positiv bestimmt worden.

Das bedeutet, daß die gespaltenen Seren schwache D^U -Formen weniger häufig als die inkompletten Seren erkennen. Dies heißt für die Spender-serologie, daß die gespaltenen Seren mehr falsch - negative Ergebnisse (bei uns 2%, Abb.: 13b - 18b) als die inkompletten Seren liefern und daher für die Spender-serologie nur

bedingt geeignet erscheinen.

Mit den 15 Blutproben, die von den gespaltenen Seren als D-positiv bestimmt wurden, zeigten die kompletten Seren uneinheitliche Reaktionen; 15 Blutproben wären bei Testung mit nur einem der kompletten Seren als D-positiv, mit einem anderen als D^U klassifiziert worden.

Da die gespaltenen Seren in sich einheitlicher reagieren als die kompletten Seren, erscheinen die Ergebnisse mit den gespaltenen Seren als zuverlässiger.

Das bedeutet unserer Meinung nach, daß die 15 Blutproben von den gespaltenen Seren als "richtig" positiv bestimmt wurden. Wie bereits ausgeführt, scheint es sich bei diesen Blutproben um "unechte", starke Stellungen- D^U s, also um normale, lediglich abgeschwächte D-positive Blutproben zu handeln.

Wir halten die gespaltenen Seren aus vorgenannten Gründen für die Empfängerserologie als geeignet.

Schlußfolgerung:

Die neuen gespaltenen Seren sind nach unseren Ergebnissen für die Empfängerserologie geeignet, für die Spenderserologie wegen zu häufiger falsch-negativer Ergebnisse im Vergleich mit inkompletten Seren dagegen nur bedingt geeignet.

4.3 Die Frage der Transfusion von D-positivem Blut auf D^u-Empfänger

4.3.1 Die Immunogenität von D^u

Die Beachtung des Rh-Faktors D^u ist von praktischer Bedeutung, da dieser Faktor bei Rh-negativen Menschen durch Transfusion oder Schwangerschaft die Bildung von Anti-D auslösen kann (42, 43).

D^u scheint schwächer immunogen zu sein als D: In einer Versuchsreihe wurde eine verhältnismäßig große Anzahl von D^u-Antigen-Injektionen benötigt, um eine Anti-D-Bildung zu bewirken (33). Demgegenüber genügt meist schon eine einzige Injektion D-positiven Blutes, um bei Rh-negativen Personen eine Anti-D-Bildung auszulösen (25).

Da man die Immunogenität von D^u jedoch nicht genau kennt, werden D^u-positive Spender als Rh-positiv bewertet.

Umgekehrt liegen auch Berichte von D^u-positiven Empfängern vor, die nach Transfusion oder Schwangerschaft Anti-D bildeten (1, 9, 41). Obwohl solch eine Immunisierung wohl recht selten ist (13), hat ein D^u-Empfänger als D-negativ zu gelten.

Bei Vorliegen von D^u kann die Bedeutung dieses Faktors bei der Befundabgabe folgendermaßen zum Ausdruck gebracht werden:

"Als Spender Rh- positiv, als Empfänger Rh-negativ".

4.3.2 Schlußfolgerungen aus den Reaktionen der gespaltenen Seren mit D^U für die Transfusionspraxis

Wie bereits ausgeführt, halten wir die gespaltenen Seren für geeignet, im Gegensatz zu den kompletten Seren starke "Stellungs- D^U s" als solche zu erkennen, d.h. als D zu klassifizieren.

Definitionsgemäß können reine Stellungs- D^U s kein Auto-Anti-D bilden, da sie alle Teile eines normalen D-Antigens besitzen.

Uns ist nur ein Fall bekannt, wonach eine Frau des Phänotyps CCD^{Uee} Anti-D bildete (14). Es ist anzunehmen, daß es sich hier um einen der seltenen Fälle handelt, bei dem einem Stellungs- D^U zusätzlich ein Teil des D-Mosaiks fehlt.

Da die Immunisierung einer Person mit Stellungs- D^U sehr selten vorkommt, sind wir der Ansicht, daß D^U -Empfänger des Mosaiks CCD^{Uee} , die mit den gespaltenen Seren positiv und mit einem Teil der kompletten Seren negativ reagieren, im Gegensatz zur derzeitigen Transfusionspraxis, mit Rh-positivem Blut transfundiert werden können.

4.4. Auswertung der Familienuntersuchung S.

Da außer der Tochter der Familie S. alle Familienmitglieder Rh-positiv sind, konnte die Frage nicht geklärt werden, ob es sich hier um ein vererbt schwaches D^U handelt oder ob sich hier mehrere Ursachen für

D^U (C in Transposition zu D, Fehlen eines Teils des Mosaiks und verminderte Antigenzahl) addieren.

5. Zusammenfassung

Wir untersuchten insgesamt 89 D^U-Blutproben mit je drei inkompletten, "gespaltenen" RST-Seren^R und kompletten Anti-D-Seren.

Die neuen "gespaltenen" Anti-D-Seren basieren auf einer chemischen Modifikation von inkompletten Antikörpern der Klasse IgG, so daß diese wie komplette Seren reagieren. Durch Zusatz geeigneter Reagenzien werden die SH-Gruppen in der Hinge-Region und innerhalb der Fab-Fragmente gespalten. Hierdurch wird die Flexibilität der Fab-Fragmente derart erhöht, daß Rh-positive Erythrozyten bereits in einem Milieu niedriger Proteinkonzentrationen agglutiniert werden können.

Ein Vergleich des Reaktionsverhaltens dieser drei Seren zeigte, daß die gespaltenen Seren geeignet erscheinen, starke Stellungen-D^Us zu erkennen. Eine Differenzierung zwischen Mosaik- und genetisch bedingten D^U-Blutproben war nicht erkennbar.

Die alleinige Verwendung gespaltenen Seren kann für die Empfänger-serologie empfohlen werden. Für die Spender-serologie sind die gespaltenen Seren wegen zu häufiger falsch- negativer Ergebnisse im Vergleich mit inkompletten Seren nur bedingt geeignet.

Die gespaltenen Seren scheinen starke Stellungen-D^Us erkennen zu können. Da Stellungen-D^Us definitionsgemäß kein

Anti-D bilden können, sind wir der Ansicht, daß D^u-Empfänger, die mit allen gespaltenen Seren positiv, mit einem Teil der kompletten Seren jedoch negativ reagieren, mit Rh-positivem Blut transfundiert werden können.

6. Literaturverzeichnis

1. Argall C.I., Ball J.M., Trentelman E.J.: Presence of anti-D antibody in the serum of a D^u patient. J. Lab. Clin. Med. 41, 895 - 898 (1953).
2. Blood Group Immunology: Theoretical and Practical Concepts, Dade, Miami, Florida (1976).
3. Bush M., Sabo B., Stroup M., Masouredis S.P.: Red cell D antigen sites and titration scores in a family with weak and normal D^u phenotypes inherited from a homozygous D^u mother. Transfusion 14, 433 - 439 (1974).
4. Ceppellini R.: "Le Varianti Rh" in Ceppellini R., Nasso S., Tezilacich F., La Malattia emolitica del neonato, Milan: Ed. I.S.M.S.B., S. 140 (1952).
5. Ceppellini R., Dunn L.C., Turri M.: An interaction between alleles at the Rh locus in man which weakens the reactivity of the Rh₀ factor (D^u). Proc. Nat. Acad. Sci. 41, 283 - 288 (1955).
6. Chown B., Lewis M.: Occurrence of D^u type of reaction when CDe or cDE is partnered with Cde. Ann. Hum. Genet. 22, 58 (1957).
7. Coombs R.R.A., Mourant A.E., Race R.R.: A new test for the detection of weak and "incomplete" Rh agglutinins. Br. J. Exp. Pathol. 26, 255 (1945).
8. Fisher R.A., cited by Race R.R.: An "incomplete" antibody in human serum. Nature, Lond. 153, 771 - 772 (1944).

9. Francis B.J., Hatcher D.E., Marcouse P.M.: An Rh₀ (D) positive patient whose serum contains anti-Rh₀ (D) antibodies. *Vox Sang.* 5, 324 - 329 (1960).
10. Giles C.M.: A rapid method for routine D^u testing. *Vox Sang.* 5, 462 - 466 (1960).
11. Grove-Rasmussen M., Dreisler N., Shaw R.S., Casna E.: D^u bloods in routine Rh-typing and cross-matching procedures. *Amer. J. Clin. Path.* 26, 736 - 743 (1956).
12. Heidelberger M.: Quantitative absolute methods in the study of antigen - antibody reactions. *Bact. Rev.* 3, 49 (1939).
13. Issit P.D., Issit Ch.H.: *Applied Blood Group Serology*, 2nd Ed. 2nd Repr. (1977).
14. Issit P.D.: *Serology and Genetics of the Rhesus Blood Group System*. Montgomery Scientific Publications. (1979).
15. Jandl J.H., Castle W.B.: Agglutination of sensitized red cells by large anisometric molecules. *J. Lab. Clin. Med.* 47, 669 - 685 (1956).
16. Koller A.: Importance and frequency of the Rh factor D^u. *Wien. Klin. Wschr.* 84, 665 - 668 (1982).
17. Landsteiner K.: Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wien. Klin. Wschr.* 14, 1132 - 1134 (1901).
18. Landsteiner K., Wiener A.S.: An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for Rhesus blood. *Proc. Soc. exp. Biol. N.Y.* 43, 223 (1940).

19. Landsteiner K., Wiener A.S.: Studies on an agglutino-
gen (Rh) in human blood reacting with anti-
Rhesus sera with human antibodies. J. exp. Med. 74,
309 - 320 (1941).
20. Lawler S.D., Race R.R.: Quantitative aspects of
Rh antigens. Proc. Int. Soc. Hemat. 168 - 170
(1950).
21. Levine P., Stetson R.E.: An unusual case of in-
tra - group agglutination. J. Amer. Med. Ass. 113,
126 - 127 (1939).
22. Mourant A.E.: The distribution of the human blood
group. Blackwell, Oxford (1954).
23. Müller-Eckhardt Ch.: Laboratoriumsblätter für die
medizinische Diagnostik: Blutgruppenserologie. Med.
Kliniken und Polikliniken der Universität Gießen,
Abt. für Klin. Immunologie und Bluttransfusion.
24. Pettenkofer H.J.: Blutgruppenserologie. Labora-
toriumsblätter der Behringwerke, Beiheft. Mar-
burg (1961).
25. Pickles M.M.: Unpublished observations (1956), cited
in Mollison P.L.: Blood Transfusion in Clini-
cal Medicine, 5th Ed., Blackwell, Oxford (1972).
26. Pirofsky B., August A., Nelson H., Pittenger R.:
Rapid mass anti - D (Rh₀) typing with bromelin.
J. Lab. Clin. Med. 56, 911 - 916 (1960).
27. Race R.R., Sanger R., Lawler S.D.: The Rh antigen
D^U. Ann. Eugen. 14, 171 - 184 (1948).
28. Race R.R., Sanger R.: Blood Groups in Man, 6th
Ed., Blackwell, Oxford (1975).

29. Renton P.H., Stratton F.: Rhesus type D^U. Ann. Eugen. 15, 189 - 209 (1950).
30. Richtlinien zur Blutgruppenbestimmung und Bluttransfusion. Dtsch. Ärzteverl. Köln (1980).
31. Rosenfield R.E., Vogel P., Miller E.B., Haber G.: Weakly reacting Rh-positive (D^U) bloods. Blood 6, 1123 - 1134 (1951).
32. Rosenfield R.E., Allen F.H., Swisher S.N., Kochwa S.: A review of Rh serology and presentation of a new terminology. Transfusion 2, 287 (1962).
33. Ruffie J., Carrière M.: Production of a blocking anti - D antibody by injection of D^U red cells. Brit. Med. J. II, 1564 - 1565 (1951).
34. Schricker K.Th.: Erfahrungen mit den neuen RST-Seren^R im Vergleich zur herkömmlichen Bestimmung der Rh-Merkmale. Lab. med. 6, 143 - 146 (1982).
35. Stratton F.: A new Rh allelomorph. Nature 158, 25 - 26 (1946).
36. Stratton F., Dimond E.R.: The value of a serum and albumin mixture for use in the detection of blood group antigen - antibody reactions. J. Clin. Path. 8, 218 - 224 (1955).
37. Sturgeon P.: The Rh₀ variant - D^U. II. Its detection with a direct tube test. Transfusion 2, 244 - 255 (1962).
38. Tippet P., Sanger R.: Observations on subdivisions of the Rh antigen D. Vox Sang. 7, 9 - 13 (1962).

39. Unger L.J., Wiener A.S.: Observations on blood factors Rh^A, Rh[∞], Rh^B and Rh^C. Amer. J. Clin. Path. 31, 95 - 103 (1959).
40. Unger L.J., Wiener A.S., Katz L.: Studies on blood factors Rh^A, Rh^B and Rh^C. J. exp. Med. 110, 495 - 510 (1959).
41. Unger L.J., Wiener A.S., Weiner L.: New antibody (anti - Rh^B) resulting from blood transfusion in an Rh-positive patient. J.A.M.A. 170, 1380 - 1383 (1959).
42. van Loghem J.J.: Production Rh agglutinins anti-C and anti- E by artificial immunization of volunteer donors. Brit. Med. J. 2, 958 (1947).
43. Vogel P., Rosenfield R.E.: Unpublished observations, cited by Rosenfield R.E., Vogel P., Miller E.B., Haber G. (1951): Weakly reacting Rh-positive (D^u) bloods. Blood 6, 1123 - 1134 (1951).
44. Wiener A.S.: Genetic theory of the Rh blood types. Proc. Soc. exp. Biol. N.Y., 54, 316 - 319 (1943).
45. Wiener A.S.: The Rh series of allelic genes. Science 100, 595 - 597 (1944).

7. Lebenslauf

5.11.1957

Geboren als Tochter des Landwirts
Benedikt Harzenetter und seiner
Ehefrau Theresia, geb. Mooser, in
Günz, Gemeinde Westerheim

September 1964

Eintritt in die Grundschule in Günz,
Gemeinde Westerheim

September 1968

Wechsel auf das neusprachliche Vöh-
lin-Gymnasium in Memmingen

Juni 1977

Abitur am Vöhl-Gymnasium

Oktober 1977

Beginn des Studiums der Theologie
und Germanistik an der Universität
Augsburg

April 1978

Beginn des Studiums der Medizin an
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

März 1980

Ärztliche Vorprüfung

März 1981

1. Ärztliches Staatsexamen

März 1983

2. Ärztliches Staatsexamen

Mai 1984

3. Ärztliches Staatsexamen

September 1984

Heirat mit dem Grafik-Designer
Klemens Ganzenmüller

Juli 1984 - Februar 1985

Assistenzärztin in der Zentralen
Anästhesieabteilung des Kreiskran-
kenhauses Memmingen

März 1985 - Dezember 1985

Assistenzärztin auf der chirur-
gischen Abteilung des Kreiskran-
kenhauses Ottobeuren

Seit Januar 1986

Assistenzärztin auf der Inneren
Abteilung des Kreiskrankenhauses
Ottobeuren

